



Université de Montréal

# **Analyse génotypique des cellules initiatrices de tumeurs exprimant CD133 dans le neuroblastome**

par

Sonia Cournoyer

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
en Pathologie et biologie cellulaire

mars 2012

© Sonia Cournoyer, 2012

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Analyse génotypique des cellules initiatrices de tumeurs exprimant CD133 dans le  
neuroblastome

Présenté par :  
Sonia Cournoyer

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre. Nicole Lemieux, président-rapporteur  
Dr. Hervé Sartelet, directeur de recherche  
Dr. Johnny Deladoey, membre du jury

## Résumé

Le neuroblastome (NB) est la tumeur solide extracrânienne la plus fréquente et mortelle chez les jeunes enfants. Il se caractérise par une résistance à la chimiothérapie possiblement en partie dû à la présence de cellules initiatrices de tumeurs (TICs). Des études ont mis en évidence le rôle de CD133 comme un marqueur des TICs dans divers types de cancers. Les buts de notre travail étaient d'abord de démontrer les vertus de TICs des cellules exprimant CD133 et ensuite, en utilisant une analyse globale du génome avec des polymorphismes nucléotidiques simples (SNPs), d'effectuer une analyse différentielle entre les TICs et les autres cellules du NB afin d'en identifier les anomalies génétiques spécifiques.

Des lignées cellulaires de NB ont été triées par cytométrie de flux afin d'obtenir deux populations: une enrichie en CD133 (CD133<sup>high</sup>), l'autre faible en CD133 (CD133<sup>low</sup>). Afin de déterminer si ces populations cellulaires présentent des propriétés de TICs, des essais sur les neurosphères, les colonies en agar mou et les injections orthotopiques de 500 cellules sélectionnées dans 11 souris ont été réalisées. Après une isolation de l'ADN des populations sélectionnées, nous avons effectué une analyse génotypique par SNP utilisant les puces « Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 ». Pour vérifier l'expression des gènes identifiés, des Western Blots ont été réalisés.

Nos résultats ont démontré que la population CD133 avait des propriétés de TICs *in vitro* et *in vivo*. L'analyse génotypique différentielle a permis d'identifier deux régions communes (16p13.3 and 19p13.3) dans la population CD133<sup>high</sup> ayant des gains et deux autres régions (16q12.1 and 21q21.3) dans la population CD133<sup>low</sup> possédant des pertes d'hétérozygoties (LOH). Aucune perte n'a été observée. Parmi les gènes étudiés, l'expression protéique d'éphrine-A2 était corrélée à celle de CD133 dans 6 tumeurs et 2 lignées cellulaires de NB. De plus, l'augmentation de la concentration d'anticorps anti-éphrine-A2 dans le milieu diminue la taille des neurosphères.

Ainsi, la population CD133<sup>high</sup>, qui a des vertus de TICs, possède des caractéristiques génotypiques différentes par rapport à celle CD133<sup>low</sup>. La présence d'éphrine-A2 dans les cellules exprimant CD133 souligne son importance dans le développement des TICs. Ces résultats suggèrent la présence de potentielle cible pour de nouvelles thérapeutiques ciblant les TICs mise en évidence par l'étude génomique.

**Mots-clés :** Neuroblastome, cellules initiatrices de tumeurs, analyse génotypique, CD133, SNP

## Abstract

Neuroblastoma (NB) is the most common and deadly extracranial solid tumor of childhood characterized by a resistance to chemotherapy possibly due to the presence of tumor initiating cells (TICs). Studies showed the role of CD133 as a marker of TICs in various types of cancers. Our goals were first to demonstrate the stemness of TICs expressing CD133 and then, using a global genomic analysis with single nucleotide polymorphism (SNPs), to perform a differential analysis between TICs and other cells of NB to identify the specific genetic abnormalities.

NB cell lines were sorted by flow cytometry to obtain two populations: one enriched in CD133 (CD133<sup>high</sup>), the other low in CD133 (CD133<sup>low</sup>). To determine whether these cell populations have TICs properties, we test the ability of cells to form either neurospheres or, colonies in soft agar and we also test their carcinogenic properties by orthotopic injections of 500 selected cells in 11 mice. After a DNA extraction on selected populations, a differential genotyping analysis has been made with Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0. To verify the expression of the genes identified, Western blots had been made.

Our results have demonstrated that CD133<sup>high</sup> population presented TICs properties *in vitro* and *in vivo*. The differential genotyping analysis allowed identifying two gains common regions (16p13.3 and 19p13.3) in CD133<sup>high</sup> population and two others loss of heterozygosity (LOH) (16q12.1 and 21q21.3) in CD133<sup>low</sup> population. No losses were observed. Among the genes studied, ephrin-A2 protein expression was correlated to CD133 expression in 6 NB tumors and 2 NB cell lines. Also, ephrin-A2's increased concentration influenced the neurospheres by decreasing their size.

Thereby, CD133<sup>high</sup> population, which had TICs properties, possess different genotyping characteristics compared to CD133<sup>low</sup> population. The presence of ephrine-A2 in cells expressing CD133 emphasizes its importance in the development of TICs. These results suggest the presence of potential target for new therapies targeting the TICs demonstrated by the genomic study.

**Keywords:** Neuroblastoma, tumor initiating cells, genotyping analysis, CD133, SNPs

# Table des matières

Résumé .....	i
Abstract .....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures .....	vii
Liste des sigles et abréviations.....	viii
Remerciements.....	xii
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Historique et généralités du neuroblastome .....	1
1.1. L'origine du neuroblastome : Crête neurale .....	1
1.2 Épidémiologie descriptive.....	3
1.3 Importante hétérogénéité clinique.....	4
1.4 Diagnostic.....	5
1.5 Dépistage de masse.....	6
1.6 Facteurs pronostiques utilisés.....	7
1.6.1 Facteurs pronostiques cliniques .....	7
1.6.2 Facteurs histo-pronostiques.....	9
1.6.3 Facteurs pronostiques biologiques.....	10
1.7 Définition des groupes à risque dans les essais cliniques .....	11
1.8 Traitements .....	12
Chapitre 2 : Implication de la génétique dans le neuroblastome .....	14
2.1 Prédisposition familiale : ALK.....	14
2.2 Anomalie de structure : Gain de matériel génétique .....	15
2.2.1 Amplification de MYCN .....	15
2.2.2 Gain du chromosome 17q .....	17
2.3 Anomalie de structure : Perte de matériel génétique .....	18
2.3.1 Délétion du chromosome 1p.....	18

2.3.2 Délétion du chromosome 11q .....	19
2.3.3 Délétion du chromosome 14q .....	20
2.3.4 Autres délétions chromosomiques.....	21
2.4 Anomalie de nombre: Ploïdie.....	21
<b>Chapitre 3 : Les cellules initiatrices de tumeurs dans le neuroblastome .....</b>	<b>23</b>
3.1 Découverte et généralités des cellules initiatrices de tumeurs .....	23
3.2 Identification des TICs .....	25
3.2.1 SP .....	25
3.2.2 CD44 .....	25
3.2.3 CD133.....	26
3.2.4 Autres marqueurs des TICs.....	27
3.3 Résistance des TICs aux thérapies conventionnelles .....	28
3.4 TICs dans le neuroblastome.....	30
<b>Projet de recherche .....</b>	<b>33</b>
<b>Chapitre 4.....</b>	<b>33</b>
4.1 Hypothèses de travail: .....	33
4.2 Objectifs de recherche .....	34
4.3 Stratégie expérimentale.....	34
4.3.1 Les études in vitro et in vivo .....	34
4.3.2 L'étude d'analyse génotypique différentielle .....	35
4.3.3 Gènes candidats potentiels ciblant les TICs dans le NB .....	35
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>36</b>
<b>Chapitre 5.....</b>	<b>36</b>
5.1 Tumeurs.....	36
5.2 Lignées cellulaires.....	36
5.3 Extraction d'ADN.....	36
5.4 Préparation de l'ADN cible et géotypage de SNPs.....	37
5.5 Extraction protéique et Western Blot .....	38

5.6 Formation de neurosphères en présence d'anticorps anti-éphrine-A2.....	39
5.7 Analyses statistiques.....	39
Article .....	40
Chapitre 6.....	40
Résultats.....	81
Chapitre 7.....	81
7.1 Résultats de l'article p. 41 à 80 .....	81
7.2 Corrélation et implication d'éphrine-A2 dans le développement des TICs exprimant CD133 .....	81
7.2.1 Expression différentielle d'éphrine-A2 dans les tumeurs de NB CD133 <sup>high</sup> .....	81
7.2.2 Influence de l'éphrine-A2 sur la taille des neurosphères des cellules de neuroblastome .....	82
Discussion.....	84
Conclusion .....	98
Bibliographie .....	99



## Liste des tableaux

**Tableau I: Classification des NB selon les stades INSS. .... 9**

**Tableau II: Corrélation entre l'amplification de *MYCN* et le stade du NB. .... 16**

## Liste des figures

<b>Figure 1. Rosettes d’Homer-Wright dans le NB. ....</b>	<b>2</b>
<b>Figure 2. Formation des cellules de la crête neurale.....</b>	<b>3</b>
<b>Figure 3. Courbe de survie des NB basée sur les groupes à risque. ....</b>	<b>12</b>
<b>Figure 4. Amplification de <i>MYCN</i> dans le NB.....</b>	<b>17</b>
<b>Figure 5: Les propriétés des TICs. ....</b>	<b>24</b>
<b>Figure 6. Modèle structural de CD133.....</b>	<b>27</b>
<b>Figure 7 . Thérapies standards versus les stratégies thérapeutiques dirigées contre les TICs.....</b>	<b>29</b>
<b>Figure 8 . Expression d’éphrine-A2 augmentée dans les tumeurs et les lignées cellulaires de NB enrichies en CD133.....</b>	<b>82</b>
<b>Figure 9 . Effet de l’anti-éphrine-A2 sur la taille des neurosphères.....</b>	<b>83</b>
<b>Figure 10. Anomalies géniques pouvant se retrouver dans les six lignées cellulaires de NB.. ....</b>	<b>93</b>

## Liste des sigles et abréviations

**ALDH1:** Aldéhyde déshydrogénase-1

**ALK:** Anaplastic lymphoma kinase / Kinase lymphome anaplasique

**ATCC:** American Type Culture Collection

**BDNF:** Brain-derived neurotrophic factor / Facteur neurotrophique dérivé du cerveau

**BIRC5:** Inhibiteur d'apoptose 4

**CAMTA1:** Calmodulin binding transcription activator 1 / Activateur transcriptionnel liant la calmoduline 1

**CCN:** Cellules de la crête neurale

**CD133:** Cluster de différenciation 133

**CD44:** Cluster de différenciation 44

**CNV:** Variant du nombre de copies / Copy number variant

**CGH:** Comparative genomic hybridization / Hybridation génomique comparative

**CHD5:** Chromodomain helicase DNA binding protein 5 / Protéine liant l'ADN hélicase chromodomaine 5

**ChAS:** Chromosome Analysis Suite / Analyse de chromosomes

**Ch14.18:** Anticorps monoclonal chimérique 14.18

**COG:** Children's Oncology Group / Groupe d'oncologie pédiatrique

**CR:** Rémission complète

**CSC:** Cellules souches cancéreuses

**Dmins:** Double-minutes

**DOPA:** Dopamine

**EFNA2:** Éphrine-A2

**EpCAM:** Molécule d'adhésion épithéliale cellulaire

**FISH:** Fluorescence *in situ* hybridization / Hybridation *in situ* en fluorescence

**GD2:** Disialoganglioside

**GM-CSF:** Granulocyte macrophage colony stimulating factor / Facteur stimulant des colonies de granulocytes et macrophages

**GPI:** Glycosylphosphatidylinositol

**GWAS:** Genome-wide association studies / Études d'association du génome entier

**HSR:** Homogeneously staining regions / Régions homogènes de coloration

**HVA:** Acides vanyllactique et homovanillique

**INF- $\gamma$ :** Interféron gamma

**INPC:** International Neuroblastoma Pathology Classification system / Système de classification international de la pathologie du neuroblastome

**INRC:** International Neuroblastoma Response Criteria / Critères internationaux de réponse du neuroblastome

**INRGSS:** International Neuroblastoma Risk Group Staging System / Système de stadification international des groupes de neuroblastomes à risques

**INSS:** International Neuroblastoma Staging System / Système de stadification international du neuroblastome

**kpb:** Kilo paire de base

**LDH:** Lacticodéshydrogénase

**LOH:** Perte d'hétérozygotie

**L1 :** Maladie localisée sans facteurs de risque définis par image

**L2 :** Maladie localisée avec facteurs de risque définis par image

**M:** Tumeur métastatique

**mm:** Millimètre

**Mb:** Mégabase

**MR:** Réponse mixte

**MS:** Tumeur métastatique avec métastases définies à la peau, au foie et/ou à la moelle osseuse chez des enfants de moins de 18 mois

**NB:** Neuroblastome

**NME1:** Non-metastatic cells 1/ Cellules non métastatiques 1

**NMYC:** V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived / V-myc oncogène lié au myélocytomatosis viral, dérivé du neuroblastome

**NOD/SCID:** Non-obese diabetic, severe combined immunodeficient / Non obèse et non diabétique, immunodéficient combine sévère

**NGF:** Neuronal growth factor / Facteur de croissance neuronal

**nm:** Nanomètre

**NR:** Aucune réponse

**NS:** Neurosphères

**ORC6:** Origin recognition complex, subunit 6 / Complexe de reconnaissance d'origine, sous-unité 6

**PCR:** Polymerase chain reaction / Réaction en chaîne par polymérase

**PD:** Maladie progressive

**PPM1D:** Protein phosphatase, Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> dependent, 1D / Phosphatase, dépendante Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup>, 1D

**PR:** Rémission partielle

**TEM:** Transition épithélio-mésenchymateuse

**TICs:** Tumeurs initiatrices de tumeurs

**TNFRSF25:** Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25 / Superfamille des tumeurs exprimant des récepteurs du facteur de nécrose, membre 25

**TRK:** Récepteurs tyrosines kinases

**SAPE:** Streptavidine phycoérythine

**SNC:** Système nerveux central

**SNPs:** Single nucleotide polymorphisms / Polymorphismes nucléotidiques simples

**SNS:** Système nerveux sympathique

**SP:** Population à part

**STK11:** Sérine / thréonine kinase 11

**VGPR:** Rémission partielle très bonne

**VLA:** Acide vanyllactique

**VMA:** Acide vanylmandélique

**VNC:** Variants du nombre de copies

**WGSA:** Analyse de l'échantillonnage du génome entier

*À tous ceux qui m'ont épaulé*

## Remerciements

*Je voudrais remercier mon directeur, le Dr Hervé Sartelet pour son appui et ses conseils. Un remerciement spécial à son associée de recherche, Dre Carine Nyalendo qui m'a permis d'évoluer grandement dans la façon d'apprivoiser la recherche scientifique et pour sa patience sans limite.*

*Je veux aussi remercier mes collègues de laboratoire Anissa Addioui, Assila Belounis et Marie-Pier Arsenault pour leur temps, leur aide, leur réflexion et les moments mémorables passés ensemble. Sans vous, la recherche aurait été moins agréable.*

*Pour ce qui est du personnel de l'Université de Montréal, je veux remercier Marielle Chèvrefils, une technicienne à la gestion des dossiers extraordinaire, qui est toujours prête et disponible à répondre aux questions des étudiants.*

*Je veux remercier le Département de pathologie et biologie cellulaire et le CHU Sainte-Justine pour leur support financier.*

*Je veux dire aussi un énorme merci à mes proches. Premièrement, je remercie mes parents, plus particulièrement mon père, Sylvain Cournoyer, pour son écoute, sa présence et son support inconditionnel, autant dans les moments de découragement que ceux de joie. C'est le meilleur papa qu'une fille puisse rêver d'avoir. Évidemment, je veux remercier ma sœur Alexandra Keyzer-Cournoyer qui, malgré son jeune âge, m'a écouté et supporter de toutes les manières qu'une sœur sait le faire. Enfin, je voudrais remercier mes petites complices de toujours : Nancy Desrochers, Geneviève Roch, Nathalie Rivard, Marie-Ève Mondion, Josiane Thibault, Mélissa Ainey, Valérie Clermont, Carol-Anne Michault et Emilie Masson pour leur présence et leur générosité d'écoute. Depuis le début de mon cheminement, elles ont toujours été présentes et à leur manière, elles ont su me remonter le moral dans les moments difficiles. MERCI!*

# Introduction

## Chapitre 1 : Historique et généralités du neuroblastome

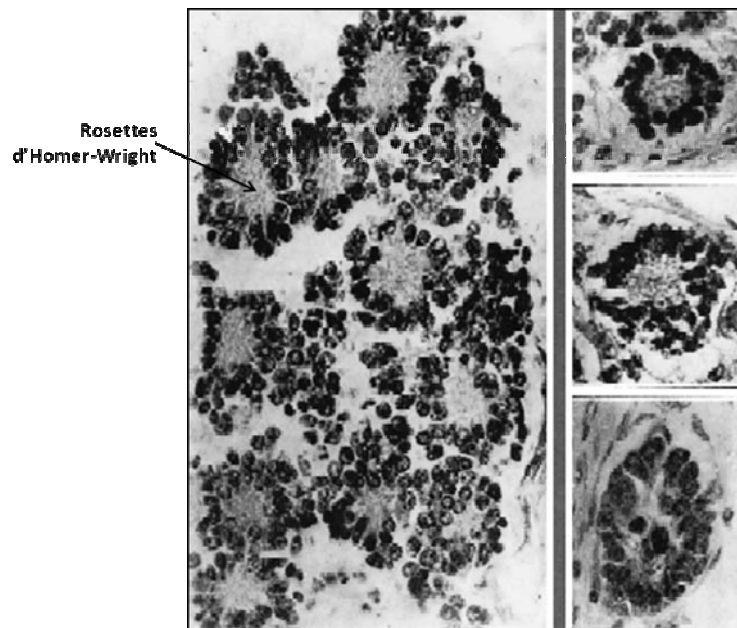
Le neuroblastome (NB) a été décrit pour la première fois par le pathologiste James Homer Wright en 1910. Les cas qu'il a analysés étaient des tumeurs surrénaliennes avec des amas de cellules qu'il a nommé rosettes. Il les a aussi retrouvées dans le tissu surrénalien fœtal et a donc suggéré le terme neuroblastome (figure 1). Wright s'est également référé à deux précédentes publications : l'une de William Pepper en 1901 décrivant une tumeur surrénalienne avec une atteinte hépatique massive chez le jeune enfant et l'autre, de Robert Hutchison en 1907 qui décrivait aussi une tumeur surrénalienne avec une propagation à l'orbite et au crâne comme étant le premier signe de la maladie. Ces deux derniers papiers ont leur importance au côté de celui de Wright, puisqu'ils ont décrit la caractéristique métastatique chez les nourrissons et les enfants plus âgés <sup>1</sup>.

D'un point de vue général, le NB est une tumeur provenant du système nerveux sympathique (SNS) qui représente 15% de tous les décès pédiatriques dus au cancer <sup>2</sup>. Caractérisée par une hétérogénéité clinique et biologique, cette tumeur a une incidence de 10,2 cas par million d'enfants âgés de 15 ans et moins et elle est la plus communément diagnostiquée durant la première année de vie <sup>3</sup>.

### ***1.1. L'origine du neuroblastome : Crête neurale***

Provenant de la partie dorsale du tube neural, la crête neurale représente une population cellulaire migratoire spécifique aux vertébrés <sup>4</sup>. Débutant sa formation à l'étape de la gastrulation du développement embryonnaire caractérisée par la transformation de l'ectoderme non neural en tube neural (figure 2), les cellules de la crête neurale (CCN) subissent le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) qui va leur donner la capacité de migrer. La TEM est impliquée dans différents processus cellulaires impliquant des changements importants dans la morphologie cellulaire, dans l'adhérence et la reconnaissance de molécules <sup>5</sup>.

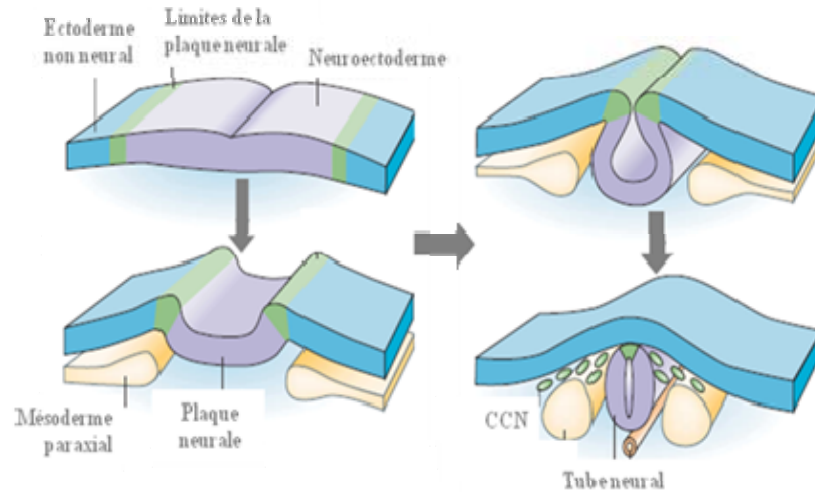




**Figure 1. Rosettes d'Homer-Wright dans le NB.** Image définissant le NB par James Homer Wright en 1910. À gauche, une tumeur montrant les rosettes avec une coloration des noyaux et de la substance fibrillaire au centre. À droite, un exemple de l'arrangement d'une rosette de cellules sympathiques primitives provenant du fœtus. Illustration adaptée de Rothenberg *et al*, 2009.

Lorsque cette TEM est terminée, les CCN délaminent et migrent vers diverses régions de l'embryon où elles vont se différencier en plusieurs types de cellules, soit les neurones périphériques, les cellules gliales des systèmes nerveux sympathiques (SNS), parasympathiques et sensoriels, les tissus conjonctifs, les mélanocytes, les cellules du muscle lisse, les cellules endocrines, les cellules des tissus squelettiques du complexe craniofacial et les cellules de Schwann <sup>6,7</sup>.

Les CCN, qui sont des cellules souches multipotentes au départ, sont destinées à perdre cette caractéristique avant ou peu après qu'elles quittent le tube neural adoptant une différenciation dépendante de la direction de leur migration <sup>8</sup>. Elles peuvent demeurer peu différenciées et immatures (ex : les neuroblastes), ou différenciées et matures (ex : les cellules ganglionnaires et les cellules de Schwann).



**Figure 2. Formation des cellules de la crête neurale.** Les limites de la plaque neurale (vert) sont induites par la signalisation entre le neuroectoderme (violet) et l'ectoderme non neural (bleu) et à partir du mésoderme paraxial sous-jacente (jaune). Pendant la neurulation, les limites de la plaque neurale s'élèvent, causant l'enroulement de la plaque neurale en un tube neural. Les CCN (vert) vont ainsi délaminer. CCN : Cellules de la crête neurale. Illustration adaptée de Gammill and Bronner-Fraser, 2003.

### ***1.2 Épidémiologie descriptive***

Au Canada, le cancer est diagnostiqué chaque année chez environ 850 enfants âgés de 0 à 14 ans. L'incidence est généralement élevée pendant les 5 premières années de vie et décline avec l'âge <sup>9</sup>. En ce qui concerne le NB, il survient 65 nouveaux cas par année. Précédé par les leucémies (incluant les leucémies myéloïdes aiguës et les leucémies lymphoblastiques aiguës) et les cancers du cerveau, le NB est le troisième type de cancer chez l'enfant. Contrairement aux tumeurs du système nerveux en général dont la proportion de décès est passée de 17,8% en 1975 à 25,7% en 2006, le taux de survie à 5 ans chez les patients atteints du NB ont augmenté de 52% (période de 1975-1977) à 74% (période 1999-2005) <sup>10, 11</sup>.

Le NB est la tumeur pédiatrique la plus fréquente chez les enfants de moins d'un an et représente entre 7-10% de tous les cancers pédiatriques. Une revue nord-américaine a montré que 40% des patients sont diagnostiqués pendant la petite enfance, 89% avant l'âge

de 5 ans et 98% avant 10 ans. Dans la plupart des pays, les garçons sont diagnostiqués à des taux équivalents ou légèrement plus élevés que les filles <sup>12</sup>. L'âge médian du diagnostic est à 17 mois et son incidence est estimée à 1 sur 7 000 naissances aux États-Unis, ce qui, par extrapolation, prédit la survenue de 12 cas par an au Québec. Cette incidence est assez uniforme à travers le monde, au moins en ce qui concerne les pays industrialisés. Dans 48% des cas, des métastases sont présentes au moment du diagnostic <sup>13-15</sup>.

Dans 5% des NB, il a été également montré qu'il existait une association entre la tumeur et certaines malformations congénitales tels que le syndrome Beckwith-Wiedemann, le syndrome de Von Recklinghausen, la maladie de Hirschsprung, le syndrome Rubenstein-Taybi et certaines malformations congénitales cardiaques <sup>12, 16-20</sup>.

### ***1.3 Importante hétérogénéité clinique***

Le NB est caractérisé par son hétérogénéité clinique. En effet, l'évolution à long terme du NB se traduit par une hétérogénéité sans égale dans le domaine de la cancérologie. Il existe trois comportements distincts : une progression rapide conduisant au décès du patient, une maturation en un ganglioneurome (tumeur bénigne) ou une régression spontanée même dans les cas au départ métastatiques <sup>12</sup>. En tenant compte de ce fait, la prise en charge clinique dépend d'une classification qui prend en compte les données cliniques, biologiques et pathologiques qui sera expliquée plus loin dans l'introduction (voir section 1.6) <sup>13, 21</sup>.

Le pronostic est hétérogène, puisque la moitié des NB surviennent sous forme métastatique chez des enfants de plus d'un an. Ils se caractérisent par un très mauvais pronostic à long terme alors que dans les stades localisés 1, 2 et 4S (tableau I), la survie à long terme dépasse 80 %, quel que soit l'âge. La probabilité de survie est donc dépendante de l'âge du patient, le stade clinique et les caractéristiques biologiques de la tumeur. Les pronostics les moins bons ont été observés chez les enfants diagnostiqués après l'âge de 12

mois, dont le stade de la maladie était avancé (métastatique) et ayant l'amplification de *MYCN*<sup>12, 21</sup>.

En ce qui concerne les métastases, l'endroit le plus commun où se développeront celles-ci est au niveau osseux qui sont présentes chez 66% des patients au moment du diagnostic puis viennent les métastases hépatiques. Les métastases hépatiques massives chez le nourrisson ont été nommées le syndrome de Pepper. Elles peuvent être associées à des métastases cutanées et au niveau de la moelle osseuse et définissent alors le stade 4S (voir plus loin). Lorsque les métastases cutanées apparaissent comme des masses d'une apparence bleue ou mauve foncée, elles sont nommées : syndrome «blueberry muffin spots». D'autres régions métastatiques moins communes associées au NB ont été trouvées, telles que dans les méninges, les poumons et le cerveau, même si presque tous les organes aient été documentés comme sites de métastases<sup>22</sup>.

#### ***1.4 Diagnostic***

La présentation clinique sera variable en fonction de la localisation de la tumeur. Les symptômes dépendront aussi de l'âge du patient et de la présence ou non de métastases au diagnostic.

Le NB peut se développer dans tout le SNS. Les tumeurs primaires surviennent en majorité dans l'abdomen (65%) et la moitié de celles-ci au niveau de la médullosurrénale. D'autres localisations tumorales dans les ganglions sympathiques paraspinaux ont également été identifiées, telles que thoraciques (20%), cervicales (1%-5%) et pelviennes (2%-3%). Des localisations inhabituelles ont également été décrites, telles que dans le thymus, les poumons, les reins et l'estomac<sup>2, 11, 22</sup>.

Le NB est caractérisé par une synthèse des catécholamines anormales qui sont synthétisées à partir de la tyrosine, un acide aminé aromatique. Le dosage fractionné des

catécholamines permet d'analyser les différents métabolites : les NB indifférenciés se caractérisent par un déficit en dopamine (DOPA) dans leur voie de synthèse catécholaminergique. Elle résulte par une accumulation et une excrétion urinaire élevée en DOPA, en acides vanyllactique (VLA) et homovanillique (HVA), une excrétion moindre en acide vanylmandélique (VMA). Donc, il est possible de calculer le rapport VMA/HVA, dont un résultat plus bas que la normale est associé au NB, c'est-à-dire un rapport urinaire VMA/HVA inférieure à 1,5. Il a été estimé que des niveaux élevés de VMA et HVA sont présents chez près de 90-95% des patients atteints d'un NB.

Donc, les niveaux des VMA et HVA combinés avec une aspiration de la moelle osseuse peuvent être utilisés pour le diagnostic du NB, dans le cas où le diagnostic tissulaire est risqué <sup>21, 23, 24</sup>.

### ***1.5 Dépistage de masse***

Le but du dépistage dans le cancer est d'identifier les tumeurs le plus tôt possible afin de traiter le patient le plus rapidement possible. Des dépistages de masse (dépistages systématiques) ont été recommandés pour la détection de plusieurs cancers, incluant ceux du colon, du sein, de la prostate, le col de l'utérus et le NB <sup>25</sup>.

Les métabolites des catécholamines produites dans le NB peuvent être facilement quantifiables dans l'urine. Ce diagnostic est très utile, car il permet un diagnostic dans de bonnes conditions de sensibilité et de spécificité. Dans les années 1980 et 1990, il a été proposé d'établir des programmes de dépistage de masse pour la détection du NB à la naissance et chez les enfants âgés entre 6 et 12 mois. À Kyoto, ce programme a été instauré chez les enfants âgés de 6 mois en 1973 et a été mis en œuvre dans tout le Japon en 1985. Ensuite, le dépistage de masse a été effectué au Québec chez les enfants âgés de 3 semaines et de 6 mois de 1989 à 1994. En 1995, l'Allemagne a introduit ce dépistage chez les enfants âgés de 12 mois et moins. Entre 1990 et 1994 en France, les NB étaient dépistés chez les

patients âgés de 4 mois. En 1995, dans ce même pays, une seconde campagne de dépistage chez les enfants âgés de 12 mois a été faite. Le constat de ces dépistages de masse fut décevant, puisque ces programmes doubleraient l'incidence du NB sans diminution significative de la mortalité chez les enfants âgés de moins d'un an, et n'avaient aucun effet sur l'incidence du NB chez les enfants âgés d'un an et plus. Ce qui signifie que certains cas de NB destinés à une régression spontanée étaient diagnostiqués par le dépistage et ne seraient jamais devenus cliniquement apparents. Donc, plusieurs enfants dont le NB a été diagnostiqué par dépistage de masse, ont subi des traitements inutiles alors que leur tumeur aurait régressé spontanément <sup>26-29</sup>. En 2008, une étude rétrospective impliquant 13 millions d'enfants atteints d'un NB nés entre 1980 et 1998, a été effectuée au Japon. Les enfants étaient divisés en trois cohortes: le prédépistage, le dépistage qualitatif et le dépistage quantitatif. Cette étude est la plus importante réalisée afin d'examiner les effets du dépistage sur la mortalité du NB. Les auteurs démontrent que le dépistage systématique n'a pas modifié la survie de NB depuis 20 ans. Des résultats similaires ont été démontrés dans des études réalisées au Québec et en Allemagne. En conséquence, le dépistage de masse ne peut pas être recommandé pour améliorer le pronostic du NB <sup>14</sup>.

### ***1.6 Facteurs pronostiques utilisés***

Des systèmes de classification (voir section 1.7) ont été implantés afin de mieux traiter les patients atteints du NB. Ces systèmes utilisent une combinaison de plusieurs facteurs histopathologiques et biologiques. Par conséquent, différentes approches thérapeutiques existent, allant d'une simple surveillance clinique à des chimiothérapies à fortes doses avec des greffes de moelle osseuse <sup>30</sup>.

#### **1.6.1 Facteurs pronostiques cliniques**

Les NB sont divisés en différents stades en fonction de l'extension loco-régionale de la tumeur primaire ainsi que de la présence de métastases et de leur localisation. Ainsi, la

classification du système de stadification international du neuroblastome (INSS : *International Neuroblastoma Staging System*) a été publiée en 1988 et révisée en 1993 (Tableau I) <sup>31</sup>. Récemment, un nouveau système de classification a émergé, soit le système de stadification international des groupes de neuroblastomes à risques (INRGSS: *International Neuroblastoma Risk Group Staging System*), qui prend en compte l'étendue de la maladie au moment du diagnostic ainsi que la présence des facteurs de risque définis : L1 (maladie localisée sans facteurs de risque), L2 (maladie localisée avec facteurs de risque), M (tumeur métastatique) et MS (tumeur métastatique avec métastases cutanées, hépatiques et/ou dans la moelle osseuse chez des enfants de moins de 18 mois). Les tumeurs M sont caractérisées par un pronostic défavorable, alors que les tumeurs MS peuvent se différencier ou régresser, même sans traitement <sup>32</sup>. Cette dernière classification est en cours d'évaluation alors que celle de l'INSS est parfaitement reconnue.

La survie des patients atteints d'un NB est fortement corrélée avec l'âge du patient au moment du diagnostic. Les patients âgés de 12 mois et moins ont généralement un pronostic favorable tandis que le fait d'être plus âgés est un signe de mauvais pronostic. Cependant, des études récentes proposent un âge seuil de 18 mois, car certains patients âgés de 12 à 18 mois ont aussi un bon pronostic. Ce seuil sera appliqué dans de futurs essais cliniques à l'exception des patients dont la tumeur est diploïde, métastatiques ou présente une amplification du gène *MYCN*. Pour ces patients, le seuil de 12 mois sera maintenu <sup>30</sup>.

**Tableau I: Classification des NB selon les stades INSS.**

Stade INSS	Description	Risque de récurrence
<b>1</b>	Tumeur localisée, restreinte au site d'origine, exérèse macroscopiquement	Bas
	complète, avec ou sans résidu microscopique; Les ganglions lymphatiques	
	ipsilatéraux sont négatifs pour la tumeur au microscope.	
<b>2A</b>	Tumeur localisée avec exérèse macroscopiquement incomplète; Les ganglions	Intermédiaire
	lymphatiques ipsilatéraux sont négatifs pour la tumeur au microscope.	
<b>2B</b>	Tumeur localisée avec ou sans exérèse macroscopiquement complète avec	
	des ganglions lymphatiques ipsilatéraux envahis. Les ganglions lymphatiques	
	controlatéraux doivent être microscopiquement négatifs.	
<b>3</b>	Tumeur unilatérale non réséquable dépassant la ligne médiane avec ou	Élevé
	sans envahissement ganglionnaire régional ou tumeur localisée unilatérale avec	
	ganglions lymphatiques controlatéraux envahis ou tumeur dépassant la ligne	
	médiane avec extension bilatérale (non réséquable) ou ganglions	
<b>4</b>	lymphatiques envahis.	
	Toutes tumeurs primaires avec extension métastatique tumorale à des ganglions	Bas
	lymphatiques à distance, l'os, la moelle osseuse, le foie, la peau et/ou d'autres	
<b>4S</b>	organes (à l'exception de ceux définis au stade 4S).	
	Tumeur primaire localisée (comme défini par les stades 1, 2A ou 2B), avec extension	
	métastatique limitée à la peau, au foie ou à la moelle osseuse (<10% de la tumeur)	
	chez des enfants âgés de moins d'un an.	

Tableau adapté de Brodeur *et al*, 1993

### 1.6.2 Facteurs histo-pronostiques

Le NB est également classifié selon le système de classification internationale de la pathologie du neuroblastome (INPC : *International Neuroblastoma Pathology Classification System*) qui est une adaptation du système de Shimada qui a été longtemps la classification utilisée à l'échelle internationale. L'INPC divise les tumeurs en deux sous-groupes (une histologie favorable ou défavorable) selon le degré de différenciation, de l'index mitose-caryorrexie et l'âge <sup>30</sup>. Ce système de classification permet de distinguer quatre catégories morphologiques: le ganglioneurome, le ganglioneuroblastome mélangé, le ganglioneuroblastome nodulaire et le NB <sup>33</sup>. Les tumeurs composées de moins de 50% de stroma Schwannien sont référées aux NB, celles composées entièrement de tissus matures sont nommées ganglioneuromes et sont des tumeurs bénignes et celles ayant plus de 50% de stroma Schwannien sont les ganglioneuroblastomes. La présence de tissu immature dans



le NB et dans celui du ganglioneuroblastome laisse envisager un comportement potentiellement malin <sup>13, 22, 34</sup>.

### 1.6.3 Facteurs pronostiques biologiques

Outre les marqueurs génétiques qui seront discutés dans le chapitre 2, des études ont démontré une relation entre les récepteurs à tyrosine kinase (TRK : *Tyrosine receptor kinase*) et l'expression de *MYCN*. En effet, les neurotrophines, telles que les facteurs de croissance neuronaux (NGF : *Neuronal growth factor*) et les facteurs neurotrophiques dérivés du cerveau (BDNF : *Brain-derived neurotrophic factor*), interviennent lors du développement du système nerveux central par les intermédiaires de leurs récepteurs : TRK-A et TRK-B. L'expression élevée de TRK-A est observée dans les NB de bas grade et sans amplification de *MYCN*. L'expression élevée de TRK-B est associée au NB de haut grade ou avec amplification de *MYCN* <sup>35</sup>.

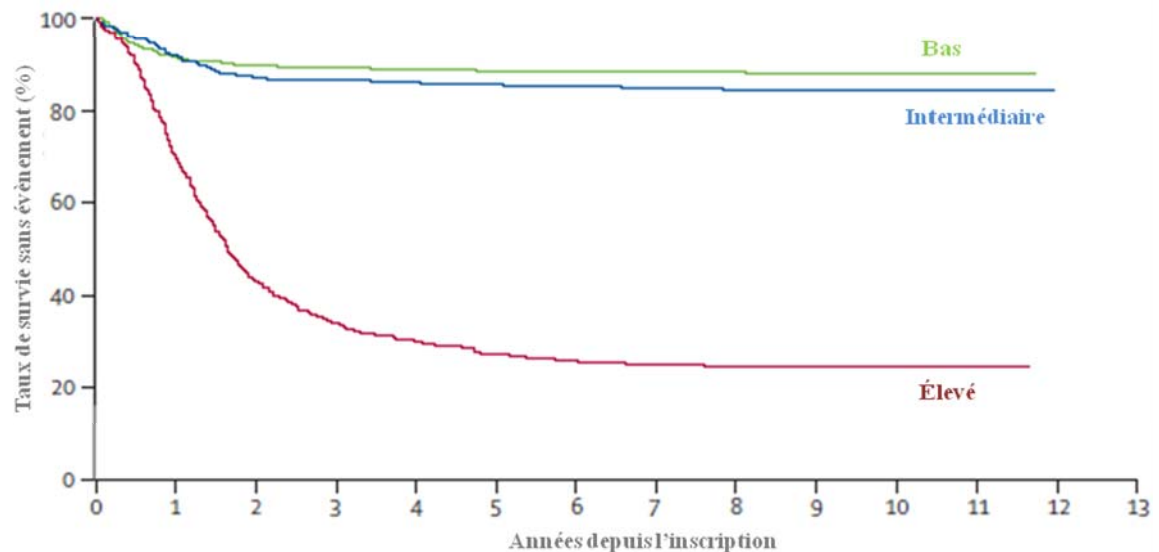
Des marqueurs sériques sont associés à un mauvais pronostic : les neurones-spécifiques-enolases (NSE). Elles sont non spécifiques au NB, mais lorsque ces dernières sont présentes à des niveaux élevés, elles corréleront significativement avec des stades avancés de NB et un taux de survie faible. Des taux élevés en ferritine, une protéine liant le fer, sont également observés chez les patients avec des stades avancés et corréleront avec un faible taux de survie. Enfin, des taux élevés en lactico-déshydrogénase (LDH), qui est un marqueur non spécifique du volume tumorale, sont associés à un mauvais pronostic <sup>36</sup>.

Enfin, il existe d'autres marqueurs, autant moléculaires que génétiques, qui sont impliqués dans la résistance à la chimiothérapie, la viabilité des cellules neuroblastiques (télomérase), le contrôle de l'apoptose et du potentiel métastatique et la différenciation qui peuvent avoir une valeur prédictive dans le NB <sup>21</sup>.

### ***1.7 Définition des groupes à risque dans les essais cliniques***

La plupart des essais cliniques vont stratifier les patients dans des groupes à risque au moment du diagnostic avant de débiter les thérapeutiques. En 1998, le groupe d'oncologie pédiatrique (COG : *Children's Oncology Group*), qui a établi des groupes de risque selon différents facteurs pronostics (voir section 1.6) a permis aux patients d'être assignés à un des trois groupes à risque (risque faible, intermédiaire et élevé). Ces groupes permettent ainsi de stratifier l'intensité du traitement. Depuis 15 ans, la stratification de groupes à risque a permis d'identifier des groupes de patients avec des résultats totalement différents (figure 3). Afin de perfectionner le système de classification des groupes à risque, ces essais cliniques veulent valider les schémas de stratification du risque existant et les intégrer à des nouveaux marqueurs de pronostic <sup>2</sup>.

Suite, à la stratification des NB, les critères internationaux de réponse du neuroblastome (INRC : *International Neuroblastoma Response Criteria*) propose une classification de réponse au traitement. Une rémission complète (CR) indique qu'il n'y a plus d'évidence de NB. Une très bonne rémission partielle (VGPR) indique que la masse primaire est réduite, qu'il n'y a pas d'évidence de métastases distant excepter des résidus intra-osseux et que les niveaux de catécholamines sont normaux. Une rémission partielle (PR) indique une diminution du volume de la tumeur primaire de plus de 50% et une diminution de plus de 50% de tous les sites métastatiques. Une réponse mixte (MR) indique au moins 50% de diminution de toutes les lésions. Aucune réponse (NR) indique moins de 50% de diminution des sites, mais pas d'augmentation supérieure à 25% dans ces lésions et pas de nouvelles lésions visibles. Enfin, la maladie progressive (PD) indique de nouvelles lésions ou une augmentation de plus de 25% du volume d'une lésion préexistante <sup>37</sup>.



**Figure 3. Courbe de survie des NB basée sur les groupes à risque.** Les patients ont été traités dans le COG entre les années 1986 et 2001. Ce groupe a classifié ces patients selon un risque bas (vert), un risque intermédiaire (bleu) et un risque haut (rouge) au moment du diagnostic basé sur des caractéristiques cliniques et biologiques. L'analyse de survie de Kaplan-Meier montre des différences importantes dans la survie sans événement pour ces groupes de patient. Illustration adaptée de Maris *et al*, 2007.

### 1.8 Traitements

Les patients ayant un NB situé dans le groupe à risque bas ont un traitement habituellement limité à l'exérèse chirurgicale. Les NB de stade 4S ne requièrent habituellement pas de thérapies à moins qu'il existe une progression tumorale ou une menace vitale. Dans plus de la moitié des cas, seule une surveillance clinique du patient permet de contrôler la régression spontanée. Dans le NB de stade 4S, le taux de guérison est supérieur à 90%<sup>38</sup>. Le NB de risque intermédiaire nécessite une chimiothérapie dite à doses minimales efficaces suivi d'un traitement chirurgicale. Le taux de guérison atteint un niveau de 80%<sup>39</sup>. Le groupe à risque élevé fait appel à la chimiothérapie néo-adjuvante, à la chirurgie, à la chimiothérapie myélo-ablative avec thérapie cellulaire et à la radiothérapie. Malgré cette combinaison thérapeutique, la survie reste globalement inférieure à 40%<sup>21</sup>.

Cependant en 2010, la combinaison de la thérapeutique standard (avec l'acide rétinoïque) associée à l'immunothérapie a permis d'augmenter le taux de survie des NB à haut risque, passant de 40% à 60% de survie à deux ans. En effet, des données précliniques ont indiqué que l'anticorps monoclonal chimérique 14.18 (ch14.18) dirigé contre un antigène associé aux tumeurs soit le disialoganglioside (GD2), possède une activité contre le NB. Cette activité se produit lorsque l'anticorps ch14.18 se combine soit au facteur stimulant des colonies de granulocytes et macrophages (GM-CSF : *Granulocyte macrophage colony stimulating factor*), soit à l'interleukine-2. Ainsi, cette immunothérapie a pour but de prévenir les rechutes chez les patients atteints de NB. GD2 est constamment exprimé par le NB et d'autres tumeurs. Dans les tissus normaux humains, GD2 est exprimé seulement sur les neurones, les mélanocytes de la peau et les fibres nerveuses périphériques sensorielles. Donc, sa forte expression dans le NB et sa distribution spécifique dans les tissus normaux rendent les études très intéressantes sur l'anticorps dirigé contre GD2 <sup>40</sup>.

Malgré toutes ces avancées thérapeutiques, il n'en demeure pas moins que les stades avancés de NB possèdent un taux de décès considérable. Cette résistance aux chimiothérapies serait probablement due à la présence d'une population distincte : les cellules initiatrices de tumeurs. Ce volet va être discuté au chapitre 3.

## Chapitre 2 : Implication de la génétique dans le neuroblastome

La caractéristique biologique du NB se retrouve au niveau de la complexité des anomalies génétiques acquises par les cellules tumorales, et certaines de ces anomalies sont de puissants marqueurs pronostiques indépendants des caractéristiques cliniques. Depuis quelques décennies, l'analyse moléculaire des NB a permis d'identifier plusieurs anomalies génétiques, telles que les mutations observées dans les NB héréditaires, les gains et pertes et/ou les LOH de matériels et l'aneuploïdie. Cependant, les essais cliniques dans le NB se basent de plus en plus sur les variables génétiques des tumeurs afin d'optimiser le choix du traitement. Ces avancées vont permettre de mieux traiter les patients atteints d'un NB en ciblant ces anomalies spécifiques <sup>21, 41</sup>.

### 2.1 Prédisposition familiale : *ALK*

Comme il a été montré pour de nombreux cancers, certains NB sont héréditaires avec une transmission autosomique dominante. Récemment, des études ont démontré que le gène du récepteur de la kinase lymphome anaplasique (*ALK* : *Anaplastic lymphoma kinase*) est un gène de prédisposition au NB familial <sup>42</sup>. Normalement, *ALK* est exprimé dans le développement du système nerveux avec un rôle dans la différenciation neuronale <sup>43</sup>. Les mutations activatrices du récepteur, qui sont localisées dans son domaine tyrosine kinase, sont retrouvées dans 80% des NB familiaux et dans 10 à 15% des NB sporadiques <sup>44</sup>. Étant situé sur le bras court du chromosome 2 (2p24), *ALK* est exprimé dans les tumeurs primaires et est généralement observé dans les tumeurs les plus agressives <sup>43</sup>.

Le fait que les lignées cellulaires de NB présentent une fréquence beaucoup plus élevée de la mutation (30%) laisse suggérer que les mutations peuvent être acquises ou sélectionnées, puisque la majorité des lignées établies de cellules sont dérivées de patients au moment de la récurrence tumorale.

Des données précliniques ont montré l'efficacité de l'inhibition d'*ALK* dans les lignées cellulaires avec la mutation ou l'amplification d'*ALK*. D'ailleurs ces observations fournissent le fondement pour les premières phases des essais cliniques <sup>3</sup>.

## ***2.2 Anomalie de structure : Gain de matériel génétique***

Des cassures au niveau des chromosomes durant la méiose produisent des anomalies de structure. Les gains de matériel sont le résultat de ces anomalies, c'est-à-dire un fragment chromosomique qui est dupliqué une ou plusieurs fois. Chez les patients atteints de NB, l'amplification de l'oncogène *MYCN* et le gain sur le chromosome 17q ont été observés <sup>41</sup>.

### ***2.2.1 Amplification de MYCN***

Décrite et retrouvée dans les lignées cellulaires en 1983, l'oncogène *MYCN* est l'un des plus puissants facteurs pronostics biologiques du NB. Lorsque les études de *MYCN* sont passées des lignées cellulaires aux tumeurs primaires, l'amplification a été confirmée comme un puissant facteur de mauvais pronostic du NB. La recherche de l'amplification de *MYCN* est utilisée de routine en clinique <sup>41, 45</sup>.

Localisée sur le bras court du chromosome 2 (2p24), cette augmentation du nombre de copies du gène est étroitement corrélée à la présence de métastases et à une progression rapide de la maladie, quels que soient le stade et l'âge du patient, et sa capacité de croître *in vitro* dans une lignée cellulaire établie <sup>46</sup>. D'ailleurs, une forte concordance entre l'amplification, le stade et le taux de survie a été démontré (Tableau II) <sup>13</sup>.

**Tableau II: Corrélation entre l'amplification de *MYCN* et le stade du NB.**

Stade au diagnostic	Amplification de <i>MYCN</i>	Survie à 3 ans
Ganglioneurome bénin	0%	100%
Stades 1 et 2	4%	90%
Stade 4S	8%	80%
Stades 3 et 4	31%	30%

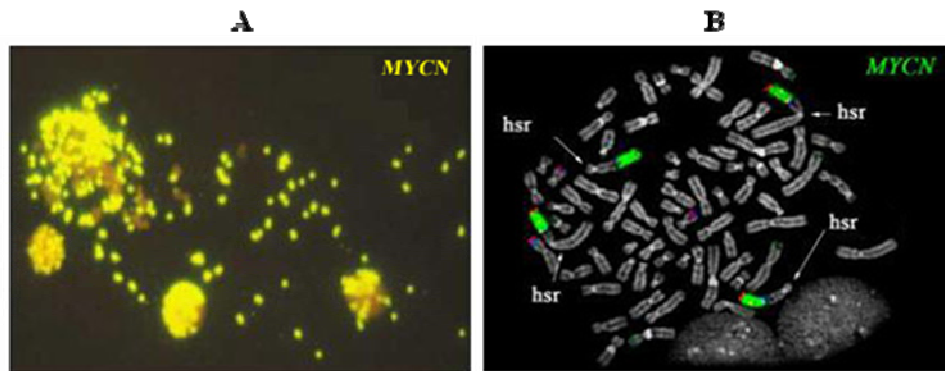
Tableau adapté de Brodeur, 2003.

L'amplification de *MYCN* est présente dans environ 20% des NB et le nombre de copies de ce gène semble affecter le taux de survie des patients. Effectivement, le NB possédant deux copies de *MYCN* a un taux de survie sans évènement situé à 70%. Ce taux s'abaisse à 30% pour les NB ayant entre 3 et 10 copies du gène pour finalement avoir un taux de 5% chez les patients avec tumeurs ayant plus de 10 copies. Ce nombre de copies a une valeur pronostic importante chez l'enfant âgé de moins de 12 mois, puisque 94% survivent sans amplification de *MYCN* contrairement à 50% avec l'amplification<sup>47</sup>.

Dans la grande région du locus 2p24, il n'y a pas que *MYCN* qui est amplifié. Au moins six autres locus sont amplifiés et présents dans les lignées cellulaires et tumeurs primaires de NB. Cependant, aucun NB n'a montré une amplification d'autres gènes sans celle de *MYCN*. Il est important aussi de souligner que d'autres gains alléliques ou des amplifications, incluant les locus 4q, 6p, 7q, 11q et 18q, ont été identifiés; mais leur prévalence ainsi que la signification biologique et clinique n'est pas claire<sup>13</sup>.

L'amplification de *MYCN* est principalement observée cytogénétiquement sous deux formes (figure 4): par du matériel extra-chromosomique sous forme de double-minutes (dmins) observé principalement dans les tumeurs primaires ou par matériel intra-chromosomique sous forme de régions homogènes colorées (HSR : *Homogeneously staining regions*) prédominante dans les lignées cellulaires de NB et la raison de leur prédominance respective demeure inconnue jusqu'à présent<sup>26</sup>. De plus, puisque

l'association importante entre l'amplification de *MYCN* et le gain chromosomique en 17q a été démontré, plusieurs évidences ont suggéré que l'amplification de *MYCN* sous la forme HSR peut parfois être physiquement associée au chromosome 17 ou au matériel du 17q, 17q étant un site d'intégration d'une large HSR de *MYCN*<sup>48</sup>.



**Figure 4. Amplification de *MYCN* dans le NB.** L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) a permis d'identifier les deux formes observées lorsque *MYCN* est amplifié : la forme dmns (A) et la forme HSR (B). Illustrations adaptées de Brodeur, 2003 et Storlazzi *et al*, 2010.

### 2.2.2 Gain du chromosome 17q

Le gain du bras long du chromosome 17 (17q) est l'une des plus fréquentes anomalies chromosomiques du NB. Identifié en 1984, ce gain est retrouvé dans 50 à 75% des tumeurs primaires dont l'incidence se situe entre 63 et 83%. Il est associé à un mauvais pronostic avec une valeur prédictive supérieure à d'autres critères cliniques, histopathologiques et génétiques<sup>49, 50</sup>. Avec seulement 1 à 3 copies additionnelles, ce gain est retrouvé dans la moitié des tumeurs primaires et est associé à un NB plus agressif<sup>51</sup>. Le gain peut impliquer soit le chromosome entier ou un segment distal du bras long, soit le 17q21 à qter. La région du 17q peut être transloquée sur de nombreux partenaires chromosomiques, mais le plus souvent elle est située sur le chromosome 1p sous la forme d'une translocation déséquilibrée conduisant soit à une trisomie, tétrasomie et même à une pentasomie de la région 17q21-qter. D'ailleurs, une corrélation statistique entre une



délétion du chromosome 1p36 et un gain chromosomique en 17q a été démontré. De plus, ce gain partiel du chromosome 17 est fortement associé aux patients âgés de plus d'un an, à l'amplification de *MYCN*, la délétion de la région 1p et à une diploïdie <sup>52</sup>.

Une région préférentielle du 17q22-qter suggère une surexpression de plusieurs gènes conférant un avantage sélectif pour ces cellules tumorales, tels que *BIRC5* (favorise la survie cellulaire dans le NB), *NME1* (possiblement suppresseur de métastases) et *PPM1D* (rôle dans la pathogenèse du NB). Cependant aucune de ces gènes ne fait l'objet d'un consensus <sup>51, 53-55</sup>.

### ***2.3 Anomalie de structure : Perte de matériel génétique***

Tout comme les gains, les pertes de matériel sont associées aux anomalies de structure par une délétion sur les chromosomes. Les conséquences d'une délétion chromosomique dépendent de sa longueur et des gènes amputés. Des délétions de matériel chromosomique sont observées dans le NB, notamment les pertes des régions 1p et 11q.

#### **2.3.1 Délétion du chromosome 1p**

La délétion du bras court du chromosome 1 (1p) est la première des anomalies génétiques publiées en 1977 dans le NB. Cette délétion a été observée dans les lignées cellulaires de NB et dans 25 à 35% des tumeurs primaires <sup>56</sup>. Ce pourcentage est augmenté entre 70 et 80% dans les NB à hauts risques. Avec le temps, les études ont permis de confirmer cette observation en mettant en évidence une perte d'hétérozygotie (LOH) sur le chromosome 1p dans 19 à 36% des tumeurs primaires <sup>57</sup>. La délétion 1p est fortement corrélée à un mauvais pronostic, puisqu'elle est observée dans les stades avancés du NB. Les stades précoces non métastatiques ne montrent pas cette altération du chromosome 1 <sup>58</sup>. Avec une incidence variant entre 22 et 89% selon les études, la région commune supprimée s'étend de 1p36.31 à pter. Des études ont observé de petites délétions interstitielles au sein

de la région 1p36 dans certains NB, mais les patients avec ce type de délétion progressait rarement au stade 4 contrairement à la délétion terminale <sup>59</sup>.

La région 1p36-pter pourrait être l'endroit où se situent un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeur dont la perte contribuerait au développement et à la progression du NB. Parmi plusieurs gènes décrits dans la littérature, certains semblent intéressants. Les expressions faibles des gènes *CAMTA1*, *TNFRSF25* sont associées à un pronostic défavorable et à la délétion de 1p et l'amplification de *MYCN* dans les lignées de NB. Celui qui semble le plus intéressant, le gène *CHD5*, dont l'expression est absente dans les lignées cellulaires de NB et possède une expression préférentielle dans les tissus neuraux. De plus, il existe une corrélation inverse entre l'expression de *CHD5* et la délétion 1p <sup>60</sup>

Même s'il y a eu des rapports contradictoires concernant le pouvoir prédictif de la délétion 1p36, des études plus récentes précisent que cette délétion est prédictive d'une mauvaise évolution de la maladie, mais ne modifierait pas la survie globale des patients <sup>61</sup>. Cette anomalie a une corrélation forte avec l'amplification de *MYCN*. Étant toutes les deux corrélées à de mauvais résultats, il est difficile de savoir si elles sont des variables pronostiques indépendantes. La plupart des cas avec une amplification de *MYCN* possède aussi la délétion 1p, mais l'inverse n'est pas souvent observé. Ce fait indique que la délétion 1p pourrait précéder le développement de l'amplification <sup>13</sup>.

### 2.3.2 Délétion du chromosome 11q

Décrite en 1993, la délétion au niveau du bras long du chromosome 11 (11q) est observée dans 44% des tumeurs primaires de NB <sup>62, 63</sup>. La région commune de cette LOH est située à 11q23-qter, ce qui indique la présence probable de gènes suppresseurs de tumeur à cette localisation. Cependant, aucun gène n'a été identifié à ce jour <sup>64</sup>.

Contrairement à la LOH du chromosome 1p qui est fortement corrélée à l'amplification de *MYCN*, la LOH de 11q se produit principalement dans les NB n'ayant pas l'amplification, ce qui suggère que la délétion 11q pourrait être un marqueur pronostic intéressant, spécifiquement dans les cas de NB de hauts risques n'amplifiant pas *MYCN* <sup>64</sup>. D'ailleurs, la délétion 11q est associée avec une diminution de la survie chez les patients qui n'avaient pas l'amplification. Ceci est probablement dû au fait que peu de tumeurs ont ces deux anomalies simultanément et que lorsque cette situation survient, la valeur pronostique de l'amplification de *MYCN* est dominante. Il a été démontré également que la délétion 11q est directement associée à la délétion 14q (décrite dans la section suivante), mais elle est inversement corrélée avec la délétion 1p <sup>13</sup>.

Une étude en 2010 réalisée par Fisher *et al* a permis de renforcer l'hypothèse que la délétion 11q permettrait la distinction de deux sous-groupes avec et sans anomalies du 11q. Suite à la subdivision des NB en 4 groupes (anomalies du 11q avec évolution favorable, anomalies du 11q avec évolution défavorable, 11q normal avec évolution favorable et 11q normal avec évolution défavorable) ne tenant compte que du statut de 11q, c'est-à-dire des tumeurs n'ayant aucune amplification de *MYCN* et de délétion 1p, il a été montré que la délétion de 11q est associée à une évolution défavorable <sup>65</sup>.

### **2.3.3 Délétion du chromosome 14q**

En 1989, une LOH au niveau du bras long du chromosome 14 (14q) ressort comme anomalie récurrente dans le NB <sup>66</sup>. Retrouvée dans 20 à 25% des tumeurs primaires de NB, la région consensus de délétion est en 14q23-q32. Une délétion interstitielle a également été observée entre les locus D14S1 and D14S16 dans la région 14q32. Ayant une incidence dans le NB variant entre 33% à 50% <sup>67</sup>, la perte allélique en 14q serait corrélée à la LOH de la région 11q, mais une corrélation inverse existerait avec la délétion 1p et l'amplification de *MYCN* <sup>68</sup>.

En 1992, trois modèles communs de la modification génétique a été proposé : (a) tumeur sans LOH et sans amplification du gène *MYCN*, (b) tumeur avec LOH 1p et amplification du gène *MYCN* (peu importe le statut de 14q) et (c) tumeur avec LOH 14q sans amplification du gène *MYCN*. Donc, la présence de la délétion 14q pourrait être utilisée pour identifier un groupe génétique de NB n'ayant pas l'amplification de *MYCN*. Malgré tout, aucune association significative n'a été trouvée avec le diagnostic, la ploïdie et l'évolution de la maladie. Ainsi, la signification de la LOH en 14q reste à déterminer <sup>68</sup>.

### **2.3.4 Autres délétions chromosomiques**

Des études ont montré qu'il y avait d'autres délétions impliquées dans le NB; mais leurs significations biologiques et cliniques ne sont pas élucidées. Cependant, une délétion sur le bras court du chromosome 3 (3p) semble influencer l'acquisition du potentiel métastatique. Présente dans 22% des NB, la délétion 3p serait présente dans les tumeurs de stades 3 et 4. Cependant, elle est aussi observée dans quelques stades de bas risques. De plus, une analyse statistique a démontré une association significative entre les délétions 11q et 3p <sup>69</sup>. Cependant, ce fait semble être contesté, puisqu'il semble plus plausible que les délétions indépendantes 3p et 11q confèreraient un avantage de croissance au NB. Bref, d'autres données sont requises afin de déterminer si les co-délétions 3p et 11q sont en corrélation avec le NB des stades avancés <sup>70</sup>. Enfin, des délétions observées en 4p, 5q, 9p et 18q ont été mises en évidence, mais aucune association aux divers critères biologiques ou cliniques n'a été faite <sup>71,72</sup>.

## **2.4 Anomalie de nombre: Ploïdie**

Lorsqu'une altération dans le nombre de chromosomes est observée, il s'agit de gains ou de pertes de chromosomes entiers conduisant à des variations de ploïdie <sup>26</sup>. La première étude ayant montré une anomalie de nombre dans le NB fut décrite en 1987. L'étude a montré que les caryotypes étudiés à des stades précoces de NB étaient triploïdies

tandis que ceux des stades avancés étaient diploïdies <sup>73</sup>. Depuis cette avancée, le NB est divisé en deux groupes selon l'index d'ADN : un groupe avec un ADN nucléaire proche de la diploïdie (environ 45%) et l'autre groupe avec un ADN nucléaire proche de la triploïdie (environ 55%). Il a été démontré que les hyperploïdies (51-57 chromosomes) ou les triploïdies (58-80 chromosomes) sont dues à une erreur dans la mitose conduisant à des gains et des pertes de chromosomes entiers survenant chez les enfants de moins de 12 mois. Ces types de ploïdie sont accompagnés d'un pronostic favorable contrairement à celui des diploïdes (44-50 chromosomes) ou tétraploïdes (81-103 chromosomes) qui possèdent une instabilité génomique entraînant des réarrangements chromosomiques, tels que des translocations déséquilibrées. Même si ces divers types de ploïdie ont une ségrégation inadéquate lors de la mitose, les causes moléculaires demeurent inconnues <sup>30</sup>.

Malheureusement, ces découvertes en génétique n'ont pas réussi à élucider les échecs de traitement survenant dans le NB. D'autres éléments présents dans ces tumeurs permettraient une meilleure prise en charge des patients.

### **Chapitre 3 : Les cellules initiatrices de tumeurs dans le neuroblastome**

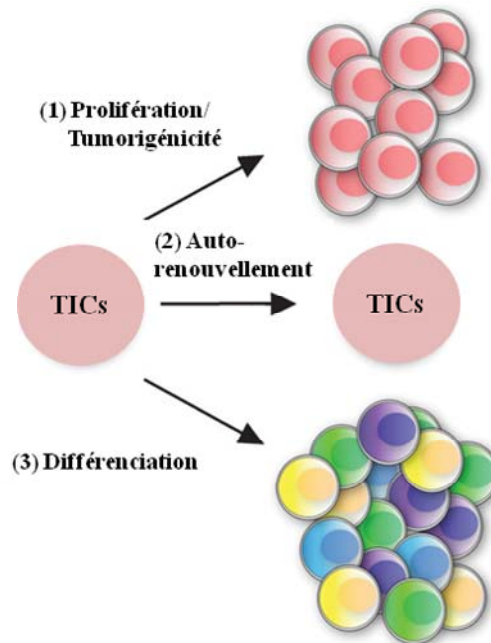
Depuis plusieurs décennies, les avancées scientifiques et technologiques ont permis aux chercheurs de produire une abondance de connaissances dans le domaine de la biologie du cancer, telles que l'identification des gènes, des protéines, des allèles mutantes, des voies de signalisation ainsi que des mécanismes impliqués dans la résistance à des thérapies. Malgré toutes ces connaissances et les succès obtenus lors de l'application en clinique, le cancer reste une cause majeure de décès. La théorie des cellules initiatrices de tumeurs (TICs) ou communément appelées cellules souches cancéreuses (CSC) a incité les chercheurs à réexaminer les faits déjà établis comme l'initiation et la progression tumorale et la résistance thérapeutique observées chez les patients atteint d'un cancer <sup>74</sup>.

#### ***3.1 Découverte et généralités des cellules initiatrices de tumeurs***

Le concept des TICs (ou CSC) et de leur application au cancer à débiter au 19<sup>ème</sup> siècle. En 1937, une équipe avait établi qu'une cellule tumorale de souris pouvait initier une nouvelle tumeur. Entre les années 1965 et 1975, de multiples études ont rapporté des TICs dans les tumeurs hématologiques malignes puisqu'un seul petit sous-ensemble de cellules cancéreuses est capable de prolifération extensive. Enfin, le chercheur John Dick a démontré l'intérêt de la théorie des TICs dans les leucémies myéloïdes aigues en 1995 <sup>75</sup>.

À la même époque où des études sur les TICs furent effectuées dans les leucémies, la théorie des TICs a été démontrée dans les tumeurs solides. En effet, des études ont montré que les cellules tumorales sont hétérogènes et que seulement une petite population de ces cellules est capable de former des clones *in vitro* et *in vivo* <sup>76, 77</sup>. Tout comme la population isolée dans les leucémies, celle dans les tumeurs solides mène à émettre l'hypothèse que seules ces cellules sont tumorigènes et que celles-ci pourraient être considérées comme des TICs <sup>78</sup>.

L'auto-renouvellement, une des caractéristiques d'une cellule souche non cancéreuse, consiste en une division cellulaire dans laquelle l'une ou les deux cellules filles restent indifférenciées. Ainsi, la possibilité de donner lieu à une autre cellule souche avec les mêmes possibilités de proliférer que la cellule parentale peut être conservée <sup>79</sup>. En plus de l'auto-renouvellement, les cellules souches ont la capacité de se différencier, générant ainsi des cellules matures d'un tissu particulier. Lorsque les cellules souches non cancéreuses subissent une mutation, elles deviennent des TICs <sup>80</sup>. Les TICs sont définies aussi par l'auto-renouvellement, une caractéristique qui entraîne la tumorigénèse, et par la capacité à se différencier, une propriété qui génère la plupart des cellules dans la tumeur (figure 5). Donc, la tumeur est composée d'une petite fraction cellulaire, les TICs, et le reste de la tumeur est composée de cellules différenciées dont la capacité d'auto-renouvellement fait défaut. La fréquence des TICs dans les tumeurs et leucémies est basse ( $10^3$  à  $10^7$  cellules), soit environ 1% de l'ensemble de la population tumorale <sup>75, 81</sup>.



**Figure 5. Les propriétés des TICs.** Les TICs sont caractérisées par trois propriétés : (1) les capacités de prolifération et de croissance tumorigène sont renforcées, (2) un auto-renouvellement à long terme et (3) un potentiel de créer plus de populations tumorales différenciées sans les caractéristiques des TICs. Illustration adaptée de Schatton *et al*, 2009.

### **3.2 Identification des TICs**

L'émergence de plusieurs protéines ayant le potentiel d'identifier les TICs a déjà fait l'objet de plusieurs études. ALDH1, SP, CD44 et CD133 font partie des marqueurs pouvant servir à l'isolement de cette sous population tumorale.

#### **3.2.1 SP**

Plusieurs tumeurs contiennent une population à part (SP : *Side population*) qui possède une résistance aux médicaments. L'analyse de SP est une méthode classique utilisée afin d'isoler les TICs. Par cytométrie de flux, l'identification et l'isolement des TICs de lignées cellulaires de NB sont basées sur leur tendance à exclure le colorant Hoechst<sup>82</sup>. Avec ce colorant, les cellules Hoechst négatives de NB sont ainsi isolées. Il a été démontré que cette fraction cellulaire négative (SP) est enrichie en TICs puisqu'elle possède leurs propriétés, soit une habilité à proliférer et une capacité de différenciation rapide<sup>83</sup>.

#### **3.2.2 CD44**

La glycoprotéine transmembranaire CD44 joue un rôle dans la tumorigénicité et le pouvoir métastatique de différents modèles animaux<sup>84</sup>. La CD44 est également connue pour être une cible en amont de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, voie qui est connue pour son implication dans le cancer ainsi que dans le maintien de l'état indifférencié des TICs<sup>85</sup>. Cette glycoprotéine a été le premier marqueur identifié dans les TICs provenant d'une tumeur solide dans le cancer du sein. Puisque la CD44 a de nombreux variants d'épissage, il se peut qu'un de ces variants soit spécifique aux TICs<sup>80</sup>.

Un phénotype de population cellulaire a été démontré comme étant un marqueur des TICs qui est une expression combinée de deux marqueurs sur la surface cellulaire : CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>. Dans le cancer du sein, les niveaux d'expression de gènes proinvasifs, par exemple IL-1 $\alpha$ , étaient plus élevés dans la sous population CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> *in vitro*. De plus,

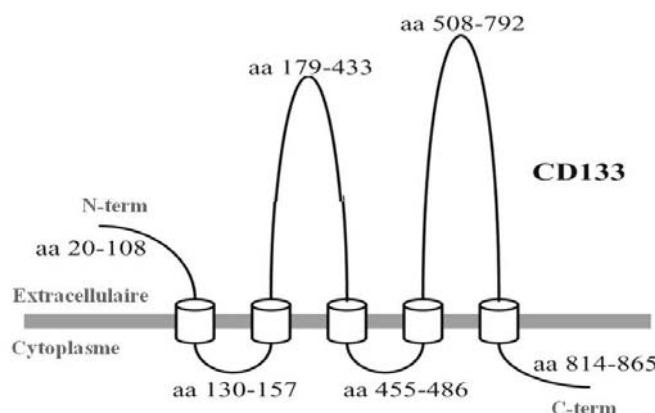


cette population avait des propriétés invasives et elle était capable d'exprimer plusieurs gènes qui favorisent la formation des métastases pulmonaires et osseuses <sup>86</sup>. Les marqueurs CD44 et CD24 étant associés aux caractéristiques des TICs et aux propriétés épithéliales différenciées respectivement, toutes les données mentionnées ci haut ont également été démontrées dans les carcinomes primaires du sein <sup>87</sup>.

Cependant, lorsque la CD44 n'est pas exprimée dans le NB, elle est associée à un mauvais pronostic jumelé avec les stades tumoraux avancés et elle est corrélée à l'amplification du gène *MYCN*. Il a été montré que des cellules n'exprimant pas CD44 (fraction négative de la CD44) forment des tumeurs dans le modèle murin NOD/SCID- $\gamma$ c et ont un potentiel métastatique par l'infiltration de la moelle osseuse et de la rate. Lors des analyses d'expression génique, la fraction négative de la CD44 a révélé une diminution de l'apoptose en engendrant une progression incontrôlée du cycle cellulaire, ce qui supporte l'identification des TICs <sup>88</sup>.

### 3.2.3 CD133

La glycoprotéine possédant cinq domaines transmembranaires, la CD133 ou nommée Prominin-1 (figure 6), est l'un des marqueurs de cellules ayant montré des caractéristiques semblables à celles des TICs. Même si la fonction biologique demeure à ce jour inconnue, la population cellulaire enrichie en CD133 serait impliquée dans la maintenance des propriétés des TICs en supprimant la différenciation <sup>80</sup>. Ayant été découverte pour la première fois comme marqueur des cellules souches hématopoïétiques en 1997, la CD133 a été identifiée comme marqueur des TICs dans différents types de tumeurs cérébrales incluant le glioblastome multiforme, le médulloblastome et l'épendymome. Aussi, la CD133 a été utilisée dans l'identification des TICs dans les carcinomes colorectaux et pancréatiques. Enfin, autant chez l'humain que chez le modèle murin, cette glycoprotéine est un marqueur des cellules souches non cancéreuses et probablement aussi dans celles pancréatiques <sup>89, 90</sup>.



**Figure 6. Modèle structural de CD133.** Topologie du polypeptide mature de CD133. Le peptide signal de N-terminal (aa 1-19) n'est pas illustré. La partie N-terminale est extracellulaire et celle C-terminale est cytoplasmique. Les cylindres représentent les régions transmembranaires. Illustration adaptée de Bidlingmaier *et al.* 2008.

Dans le NB, de récentes études ont démontré un lien entre la CD133 et cette tumeur pédiatrique <sup>91-93</sup>. En effet, une étude a trouvé que ce marqueur réprime la différenciation cellulaire et l'expression protéique de marqueurs de différenciation *in vitro*. De plus, cette étude a démontré que la CD133 accélère la prolifération cellulaire, la croissance indépendante de l'ancrage lors de la formation de colonies et la formation de tumeurs *in vivo* <sup>91</sup>.

### 3.2.4 Autres marqueurs des TICs

L'aldéhyde déshydrogénase-1 (ALDH1) est un enzyme intracellulaire qui oxyde les aldéhydes, convertit le rétinol en acide rétinoïque et contrôle les voies de signalisation impliqués dans la différenciation cellulaire. L'ALDH1 a été utilisé dans l'identification des TICs dans plusieurs tissus malins comme celui du sein, du colon, du pancréas, du poumon et du foie <sup>94</sup>. D'ailleurs, les cellules souches hématopoïétiques exprimant ALDH1 sont connus pour leur résistance contre les agents alkylants de la famille des oxazaphosphorines

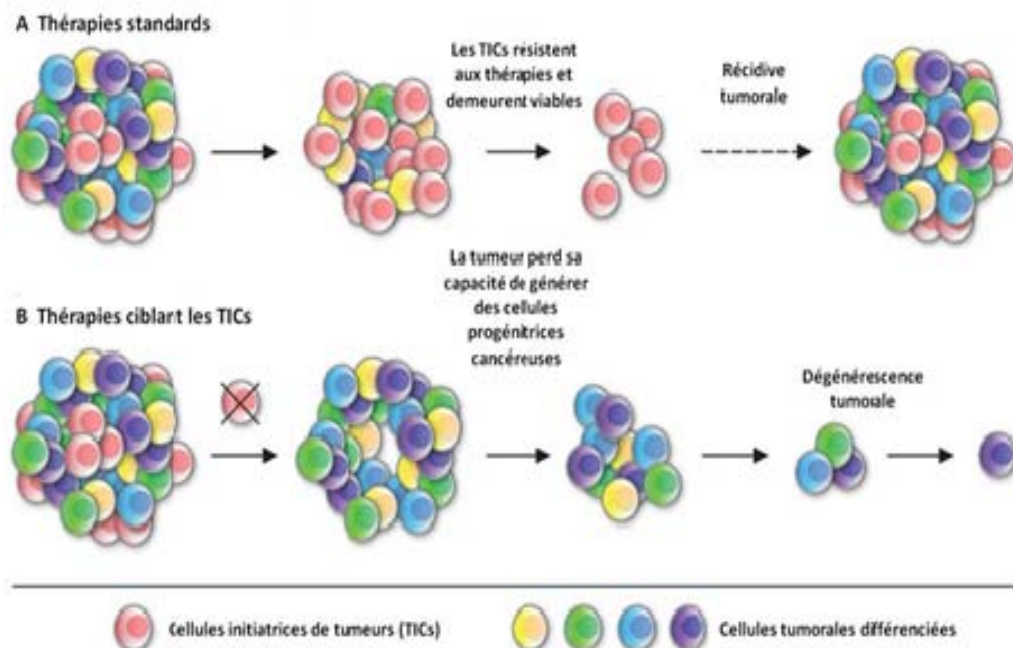
La molécule d'adhésion épithéliale cellulaire (EpCAM : *Epithelial cell adhesion molecule*), qui est exprimée dans la plupart des surfaces basolatérales des cellules épithéliales, est également l'un de ces marqueurs de TICs <sup>89</sup>. Une étude a démontré que la population cellulaire qui exprimait l'EpCAM dans les carcinomes hépatocellulaires était corrélée à une progression tumorale <sup>95</sup>. Cette glycoprotéine transmembranaire est également exprimée dans les carcinomes du cerveau et du cou, de l'ovaire, du colon, du sein, du rein et des poumons <sup>96</sup>.

De nouveaux marqueurs sont en cours d'études. Les protéines DCAMKL-1, LGR5 et BMI1 seraient également des marqueurs retrouvés dans les TICs. La translocation nucléaire de  $\beta$ -caténine distingue les cellules souches normales de celles provenant des adénomes et une étude a montré que la  $\beta$ -caténine était nucléaire dans les cellules d'adénomes DCAMKL-1 positives. Les cellules du cancer colorectal exprimant la LGR5 ont montré une meilleure résistance à la radiation. D'autres études ont montré que cette dernière est exprimée dans plusieurs cellules de l'épithélium intestinal. Donc, de futures études vont démontrer si la LGR5 est vraiment un marqueur de TICs ou de cellules progénitrices. Il a été montré que la BMI1 marque une sous-population de cellules acineuses différenciées capables d'auto-renouvellement pour plus d'un an. La BMI1 jouerait un rôle général dans l'auto-renouvellement des TICs ainsi que dans la maintenance des habiletés prolifératives des cellules différenciées <sup>80</sup>. La découverte de ces nouveaux marqueurs pourra, à long terme, aider à mieux cibler ces TICs et ainsi concevoir de nouvelles thérapies ciblant cette population cellulaire.

### ***3.3 Résistance des TICs aux thérapies conventionnelles***

Les découvertes ne cessent de croître dans le traitement des tumeurs. L'utilisation de traitements chimiothérapeutiques afin de réduire la masse tumorale ne cesse pas d'être améliorée, mais la population agressive des TICs présente au sein même de la tumeur est capable d'engendrer une résistance contre ces agents chimiothérapeutiques, menant à une

récidive tumorale <sup>97</sup>. Il semble qu'une majorité des cellules souches de n'importe quel tissu possède une résistance plus importante face à la chimiothérapie comparativement aux types de cellules matures associés aux divers tissus correspondants. Les raisons qui expliquent cette résistance ne sont pas totalement connues, mais des niveaux élevés d'expressions protéiques anti-apoptotiques et la présence de transporteurs ABC, comme des gènes de résistance multiples, expliquent en partie cette résistance associée aux TICs <sup>98, 99</sup>. Bref, si les thérapies étaient plus spécifiques et dirigées contre les TICs, les réponses tumorales seraient plus durables et peut-être que la guérison des tumeurs métastatiques pourrait être obtenue (figure 7).



**Figure 7 . Thérapies standards versus les stratégies thérapeutiques dirigées contre les TICs.** A: Les thérapies tumorales conventionnelles peuvent réduire la taille du cancer en éliminant l'ensemble de la population tumorale dans un premier temps, mais les TICs résistantes demeurent viables après le traitement et ainsi, elles rétablissent la croissance tumorale ce qui engendre la récidive tumorale. B: De nouvelles thérapies ciblant les TICs bloquent leur habileté de générer des cellules cancéreuses progénitrices, ce qui inhibe la croissance tumorale et pourrait conduire à une dégénérescence tumorale. Illustration adaptée de Schatton *et al*, 2009.

Une étude démontrant l'utilité des marqueurs de TICs ainsi que leur résistance face aux médicaments chimiothérapeutiques a été réalisée dans les TICs de tumeurs provenant du cerveau. Suite à la séparation des TICs par le marqueur CD133, la population cellulaire enrichie en CD133 était plus résistante lors de leur mise en contact avec les agents chimiothérapeutiques standards. Aussi, les TICs isolées de glioblastomes étaient plus résistants aux agents comme le témozolomide, le carboplatine, le paclitaxel et l'étoposide. Il a même été démontré que les glioblastomes récurrents ont une expression en CD133 plus élevée, ce qui leur confère un taux de survie plus élevé et ce malgré l'application des thérapies <sup>80</sup>.

Dans les systèmes précliniques et ultimement dans ceux cliniques, les critères d'évaluation expérimentale devraient inclure le phénotype et la fonction des TICs en plus de la réduction de la masse tumorale. Plusieurs approches pourraient être utiles, puisque ces approches pourraient améliorer la réponse à la thérapie systémique, en toute connaissance des concepts des TICs. Ainsi, l'ablation des TICs en utilisant des agents antitumoraux, tels que des anticorps monoclonaux, de petites molécules, des virus oncolytiques ou des cellules immunitaires activées serait une option. D'autres options, comme le blocage des fonctions des TICs, le renversement de la résistance des TICs et les thérapies dirigées vers la différenciation des TICs pourraient être des pistes intéressantes dans le traitement des cancers <sup>74</sup>. Le sujet des TICs semble très adapté au NB qui est souvent une tumeur métastatique qui se traduit par une chimiorésistance.

### ***3.4 TICs dans le neuroblastome***

Tel que mentionné précédemment, 40% des NB résistent à la chimiothérapie (voir section 1.8). Avec son potentiel métastatique, la tumeur résiste à de fortes doses de chimiothérapie combinées à une greffe de moelle osseuse. Si les TICs présentent une résistance naturelle à la chimiothérapie, de nouvelles thérapeutiques qui inhiberaient cette chimiorésistance pourrait être une piste intéressante dans le traitement du NB <sup>100</sup>.

C'est en 1996 que le concept des TICs a été associé au NB. En effet, une étude a montré que le traitement par l'interféron gamma (INF- $\gamma$ ) combiné au facteur de croissance nerveux (NGF), c'est-à-dire INF- $\gamma$  +/-NGF, peut réguler la croissance tumorale, mais induit aussi l'apparition des TICs dans une lignée cellulaire de NB <sup>101</sup>. Depuis ce temps, plusieurs évidences supportent l'hypothèse qu'il y a bel et bien une sous population cellulaire tumorale qui a les mêmes propriétés que les cellules souches normales (voir section 3.1) et qui modifie la tumorigenèse <sup>100</sup>.

Lors de traitement du NB, la présentation clinique suggère que les TICs existent dans cette tumeur. Tel que mentionné dans la section 1.3, la grande hétérogénéité observée dans le NB serait peut-être dû à cette population qui est capable de proliférer et de se différencier en diverses cellules tumorigéniques. Le NB de haut risque, qui engendre souvent des métastases, est connu pour avoir une récurrence tumorale malgré la combinaison de plusieurs thérapeutiques. Suite à l'isolement des TICs du NB provenant du site métastatique le plus courant, soit la moelle osseuse, une équipe a montré que les TICs de NB exprimaient des marqueurs provenant de progéniteurs de la crête neurale. De plus, elles avaient une capacité d'auto-renouvellement et pouvaient se différencier en neurones. Même que ces cellules pouvaient former des NB qui produisaient des métastases au niveau du foie, de la rate, des reins, des poumons et des surrénales suite à l'injection d'à peine 10 cellules de TICs de la moelle osseuse dans un modèle murin immunodéficient <sup>100</sup>.

Des études *in vitro* ont également montré la présence de TICs en utilisant des marqueurs comme la CD133 (voir sous-section 3.2.3), la nestine (protéine exprimée dans le cytoplasme des cellules souches et progénitrices du SNC) et le c-kit (récepteur tyrosine kinase exprimé dans les tumeurs solides) <sup>102, 103</sup>.

Une étude génotypique a également été faite sur les TICs dans le NB en 2010. Elle était la première étude sur les transcriptomes de TICs dans le NB. Elle avait pour but d'illustrer le principe selon lequel les profils d'expression spécifiques des TICs sont utiles

pour découvrir les de nouveaux traitements dans le NB. Dans leur étude, l'équipe a analysé l'ARN de lignées cellulaires provenant de NB sur des puces «GeneChip Human Exon 1.0 ST» d'Affymetrix. L'étude a révélé que certains gènes étaient fortement exprimés dans les TICs en comparaison aux cellules normales de la crête neurale. Par exemple, la kinase Aurora B était une cible thérapeutique potentielle pour la thérapie du NB. En effet, l'équipe a montré qu'un traitement avec un inhibiteur sélectif de la kinase Aurora B était cytotoxique aux TICs de NB, mais n'avait aucun effet sur les cellules normales de la crête neurale<sup>104</sup>.

En résumé, une thérapie ciblée sur les TICs permettrait d'améliorer la survie des patients avec des NB des stades 3 à 4.

# Projet de recherche

## Chapitre 4

Depuis la découverte du NB, de nombreux chercheurs ont tenté de trouver des caractéristiques à cette tumeur solide permettant d'améliorer le taux de guérison des jeunes patients. Plusieurs traits distinctifs ont été découverts, mais malgré la classification des stades de NB associée à divers traitements thérapeutiques et l'énumération de facteurs biologiques et génétiques, une importante proportion de NB, surtout celle des NB de risque intermédiaire ayant une issue clinique variable, demeure insensible aux traitements qu'on leur applique. Durant les dernières décennies, plusieurs études ont mis en évidence la présence d'une sous population agressive qui permet une récurrence tumorale à l'intérieur d'une grande diversité de tumeurs. Donc, la théorie des TICs s'applique très bien à la tumeur pédiatrique. De surcroît, plusieurs études ont mis en évidence le rôle de CD133 comme un marqueur des TICs dans divers types de cancers. Donc, la découverte de nouvelles caractéristiques dans ces TICs, qui seraient reliées à des caractéristiques cliniques, serait une avancée majeure dans la voie thérapeutique du NB.

### ***4.1 Hypothèses de travail:***

En sachant que la présence de TICs a été montrée dans le NB autant dans les lignées cellulaires que dans les tumeurs solides (voir section 3.4), que la CD133 serait un marqueur de ces TICs (voir section 3.2.3) et que la récurrence tumorale est souvent observée dans le NB des stades 3 et 4, l'hypothèse qu'un mécanisme différent serait impliqué dans ces TICs comparativement aux autres cellules tumorales serait plausible. De plus, l'origine de ce mécanisme propre à ce type cellulaire serait au niveau du génome. Donc, l'identification et la caractérisation génotypiques de ces TICs devraient permettre de mieux cibler les approches dans le traitement de ce cancer.



## **4.2 Objectifs de recherche**

Le premier objectif de recherche du présent mémoire est de démontrer les vertus des TICs, c'est-à-dire leur capacité d'auto-renouvellement et de former des tumeurs et métastases, exprimant la protéine CD133 lors d'expériences *in vitro* et *in vivo*.

Le second objectif de recherche est d'effectuer un génotypage différentiel entre les TICs et les autres cellules du neuroblastome afin d'en identifier les anomalies génétiques spécifiques.

## **4.3 Stratégie expérimentale**

Dans la perspective de réaliser les objectifs de recherche de ce mémoire, nous avons eu recours à diverses techniques expérimentales *in vitro* et *in vivo* ainsi qu'aux analyses d'expression génique et protéique. Voici un résumé des principales stratégies expérimentales utilisées durant les travaux de recherche présentés dans ce mémoire.

### **4.3.1 Les études *in vitro* et *in vivo***

Afin d'isoler les cellules ayant à leur surface cellulaire la protéine CD133, un marquage suivi d'un tri cellulaire par cytométrie de flux ont été effectués. Ensuite, nous avons évalué la capacité de cette population isolée à être des TICs avec des expériences telles que la formation de neurosphères (NS), la formation de colonies en agar mou et la formation de tumeurs et de métastases dans un modèle murin immunodéficient (NOD/SCID- $\gamma$ c) suite à l'injection orthotopique de la population cellulaire ayant le marqueur protéique CD133.

#### **4.3.2 L'étude d'analyse génotypique différentielle**

Une analyse génotypique différentielle au niveau du génome entier a été effectuée entre les cellules qui expriment le marqueur CD133 et celles qui ne l'expriment pas. Cette analyse, qui a été faite avec la collaboration de Génome Québec et de la compagnie Affymetrix, a été réalisée avec le logiciel informatique ChAS permettant l'étude des gènes sur l'entièreté des chromosomes.

#### **4.3.3 Gènes candidats potentiels ciblant les TICs dans le NB**

Suite à l'analyse génotypique différentielle, des gènes modifiés dans la population des TICs exprimant la CD133 ont été sélectionnés afin d'effectuer une analyse d'expression protéique. Plusieurs molécules ont été soumis à des Westerns Blots : la sérine / thréonine kinase 11 (STK11), le complexe de reconnaissance d'origine, sous-unité 6 (ORC6 : *Origin recognition complex, subunit 6*) et l'éphrine-A2 (EFNA2). Les résultats les plus intéressants ont été obtenus avec l'EFNA2.

# Matériel et méthodes

## Chapitre 5

### **5.1 Tumeurs**

Six tumeurs primaires de NB ont été sélectionnées en fonction de leur expression en CD133 pour des analyses par Western Blot (tumeurs 1 à 3 n'exprimant que très peu la CD133, tumeurs 4 à 6 exprimant la CD133). Ces tumeurs, provenant de patients qui ont été suivis à CHU Sainte-Justine, sont de stade 3 ou 4 selon les critères de l'INSS<sup>106</sup>. Cette étude a été approuvée par des comités d'évaluation scientifique et d'éthique de la recherche du CHU Ste-Justine (acceptation du protocole #401). Les investigateurs ont obtenu un consentement éclairé et l'accord des patients ainsi que de leurs parents.

### **5.2 Lignées cellulaires**

Les cellules SK-N-DZ, SK-N-SH et SK-N-FI proviennent de métastases de la moelle osseuse et ont été obtenues de l'«American Type Culture Collection» (ATCC). Les cellules NB-10 proviennent de l'Hôpital St. Jude (Memphis, TN, É.-U.) et elles dérivent de métastases hépatiques. Les cellules IGR-N91 et IGR-NB8 proviennent de l'Institut Gustave Roussy (Villejuif, France) et dérivent de métastases de la moelle osseuse. NB-10, SK-N-DZ, IGR-N91 and IGR-NB8 ont une amplification de *MYCN*. Les cellules sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée composée de 95% d'air et 5% de CO<sub>2</sub> et sont mises en culture dans un milieu approprié contenant du DMEM supplémenté avec 1% pénicilline / streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal (SVF).

### **5.3 Extraction d'ADN**

L'extraction d'ADN des cellules sélectionnées de NB (CD133<sup>high</sup> and CD133<sup>low</sup>) a été réalisée avec le Mini Kit QIAamp® (QIAGEN) conformément aux instructions du fabricant. La qualité des échantillons d'ADN a été vérifiée avec un gel d'électrophorèse 1,5% d'agarose et colorée avec du bromure d'éthidium. La concentration d'ADN a été

évaluée avec l'absorbance à 260 nm en utilisant une microplaque du spectrophotomètre Spectra MAX 190 (Sunnyvale, CA, É.-U.).

#### ***5.4 Préparation de l'ADN cible et géotypage de SNPs***

Les six lignées cellulaires de NB ont été prises pour faire l'analyse géotypique différentielle en collaboration avec Génome Québec. L'analyse de l'échantillonnage du génome entier (WGSA: *Genome-Wide Human SNPs Array 6.0*) d'Affymetrix®, qui contient 906 600 SNPs et 946 000 sondes pour la détection du nombre de copies, a été utilisée pour le géotypage selon les méthodes décrites par le fournisseur. Brièvement, 500 ng d'ADN génomique ont subi une étape de digestion avec les enzymes de restriction appropriées (Nsp I and Sty I) ainsi qu'une étape de ligation aux adaptateurs qui reconnaissent les 4 pb cohésives. Ensuite, les fragments d'ADN de chaque échantillon sont amplifiés par une réaction en chaîne par polymérase (PCR : *polymerase chain reaction*) selon les conditions recommandées en utilisant une amorce qui reconnaît la séquence adaptatrice. Les produits de la PCR pour chaque enzyme de restriction sont combinés et purifiés en utilisant des billes de polystyrène. L'ADN amplifié est ensuite fragmenté, marqué et hybridé sur les puces 6.0 d'Affymetrix®. Enfin, les puces SNPs hybridés sont lavées, incubées avec de la streptavidine phycoérythrine (SAPE), et marquées avec un anticorps dirigé contre un anti-streptavidine phycoérythrine biotinylé. Les puces sont numérisées avec le GeneChip Scanner 3000 7G (Bedford, UK) selon les recommandations du fabricant. Le logiciel de géotypage d'Affymetrix (GTC 4.0) est utilisé afin de changer les données brutes en un fichier (.CHP) qui peut être lu par l'utilisateur. Le logiciel d'analyse (ChAS: *Chromosome Analysis Suite*) est ensuite utilisé pour examiner le profil d'hybridation des SNPs de chacun des échantillons et leur contrôle respectif. Afin d'identifier les gènes d'intérêts, l'anomalie doit être présente dans au moins 50% des lignées cellulaires et doit avoir un gain ou une perte de matériel dans la population CD133<sup>high</sup> ou CD133<sup>low</sup>.

### ***5.5 Extraction protéique et Western Blot***

Pour l'extraction de protéines, les tumeurs ont été pesées et homogénéisées dans cinq volume de milieu homogénéisant (250 mmol/L sucrose et 10 mmol/L 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique Tris-HCl (Boehringer Mannheim; pH 7.5)) à l'aide d'un Polytron (Brinkman Instruments, Westbury, NY, É.-U.) pour obtenir des lysats cellulaires; Les culots sélectionnés de NB (CD133<sup>high</sup> and CD133<sup>low</sup>) ont été resuspendus dans 500 µl de tampon de lyse (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5% P-40 Nonidet, 1 mM orthovanadate de sodium, 1 mM fluoride de sodium) et incubés 30 minutes à 4 °C pour obtenir les lysats cellulaires; Les lysats cellulaires des tumeurs et des culots sélectionnés sont ensuite analysés après 1 heure d'incubation avec le réactif Micro BCA<sup>TM</sup> (Thermo Scientific, Rockford, IL, É.-U) à 60°C. Après, une quantité égale de protéines (20 µg) provenant des lysats cellulaires de tumeurs de NB, les protéines sont solubilisées dans un tampon de Laemmli, le tout apporté à ébullition pendant 5 minutes, séparé par SDS-PAGE, transféré sur des membranes de polyvinylidene difluoride (PVDF) et bloqué 1 heure à la température pièce avec un tampon TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) contenant 3% d'albumine sérique bovine (BSA). Ensuite, les protéines sont incubées avec les anticorps primaires toute la nuit à 4 °C. Une étape de lavage de 15 minutes des membranes de PVDF dans un tampon TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) contenant 0.1% de Tween 20 est effectuée 4 fois. Une incubation d'une heure avec les anticorps secondaires anti-chèvre, anti-lapin ou anti-souris contenus dans 3% de BSA est suivie d'une seconde étape de lavage de 15 minutes des membranes de PVDF dans un tampon TBS (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) contenant 0.1% de Tween 20, le tout étant 4 fois. Des bandes immunoréactives sont révélées après 1 heure d'incubation avec la peroxidase horseradish conjuguée à des anticorps anti-chèvre, anti-lapin ou anti-souris; les signaux sont visualisés avec un système de détection à l'ECL (PerkinElmer, Waltham, MA, É.-U). Les anticorps primaires utilisés pour cette étude sont contre l'éphrine-A2 0.2 µg/mL (AF603, R&D systems), la CD133/1 1/100 (W6B3C1, Myltenyi Biotec) et la  $\beta$ -Actine 1/5000 (ab8227, Abcam).

### ***5.6 Formation de neurosphères en présence d'anticorps anti-éphrine-A2***

Les cellules de NB SK-N-DZ sont mises en culture en triplicata dans les plaques de 96 puits ( $3 \times 10^3$ /puits) dans un milieu approprié contenant du DMEM/F12 (+ Glutamax) (3:1) (GIBCO® Invitrogen) supplémenté avec 1% pénicilline / streptomycine, 1  $\mu\text{g/mL}$  fungizone, 2% supplément B27, 20 ng/ml facteur de croissance épidermique (EGF), 25 ng/mL facteur de croissance fibroblastique 2 (FGF2) et une concentration croissante d'anticorps bloquant anti-éphrine-A2 (1 à 5  $\mu\text{g/mL}$ ) (R&D Systems). Les cellules sont maintenues à 37°C pendant 7 jours dans une atmosphère humidifiée composée de 95% d'air et 5% de  $\text{CO}_2$ . Les neurosphères sont photographiées avec une caméra Olympus Q Color 3 et comptées avec le logiciel Image-Pro Plus 7.0. La taille des neurosphères a été mesurée en pixels (<2000 : petites neurosphères; 2000-5000 : moyennes neurosphères; >5000 : grosses neurosphères).

### ***5.7 Analyses statistiques***

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées par le test ANOVA-bidirectionnel avec le logiciel Graphpad Prism.  $P < 0.05$  est considéré statistiquement significatif.

# Article

## Chapitre 6

Cette section présente les résultats de recherche effectués dans le contexte de ce mémoire. Ils sont présentés sous la forme d'un article scientifique soumis à une revue et évalué par un comité de pairs.

### Analyse génotypique des cellules initiatrices de tumeurs exprimant CD133 dans le neuroblastome

Le neuroblastome (NB) est la tumeur extracrânienne la plus commune et létale chez le jeune enfant. Malgré des thérapies combinées agressives, plus de la moitié des enfants ayant un NB avancé vont décéder dû aux métastases. De récentes données suggèrent qu'après l'utilisation de la chimiothérapie, des cellules initiatrices de tumeurs (CITs) persistent, causant ainsi une récurrence tumorale et la formation de sites métastatiques. L'objectif de cette étude est de montrer les propriétés des CITs de la population cellulaire de NB CD133<sup>high</sup> (population cellulaire enrichie en CD133) et d'identifier des anomalies génétiques. Premièrement, un isolement de la population cellulaire CD133<sup>high</sup> de lignées cellulaires provenant de NB a été fait suivi par la formation de neurosphères, des essais en agar mou et d'injections orthotopiques dans les souris NOD/SCID/IL2R $\gamma$ c. Après l'extraction d'ADN, une analyse génotypique différentielle a été réalisée avec des SNP 6.0 d'Affymetrix sur les populations CD133<sup>low</sup> et CD133<sup>high</sup> et la fréquence des anomalies retrouvées dans 36 tumeurs de NB a été déterminée. Nos résultats ont montré que les cellules CD133<sup>high</sup> de NB possèdent des propriétés de CITs, puisque les cellules CD133<sup>high</sup> formaient significativement plus de neurosphères et produisaient significativement plus de colonies en agar mou que celle CD133<sup>low</sup>. Par ailleurs, seulement 500 cellules CD133<sup>high</sup> étaient suffisantes afin de développer des tumeurs primaires et des métastases dans notre modèle murin. L'analyse différentielle génotypique a montré deux régions communes avec des gains (16p13.3 and 19p13.3) dans la population CD133<sup>high</sup> et deux LOH (16q12.1 and 21q21.3) dans la population CD133<sup>low</sup>. Ces anomalies ont été trouvées chez les patients ayant un NB et certaines étaient significativement corrélées avec l'expression de CD133. Donc, nos données ont montré que les cellules de NB CD133<sup>high</sup> possèdent des propriétés de CITs et présentent des caractéristiques génotypiques différentes comparées à celles CD133<sup>low</sup>. Nos résultats proposent un aperçu afin d'élaborer une nouvelle thérapeutique ciblant les CITs dans le NB.

## Genotype analysis of Tumour Initiating Cells expressing CD133 in neuroblastoma

Cournoyer Sonia<sup>1,2</sup>, Nyalendo Carine<sup>1,2</sup>, Addioui Anissa<sup>1,2</sup>, Belounis Assila<sup>1,2</sup>, Beaunoyer Mona<sup>3</sup>, Aumont Anne<sup>2</sup>, Teira Pierre<sup>4</sup>, Duval Michel<sup>4</sup>, Fernandes Karl<sup>2</sup>, Fetni Raouf<sup>1,2</sup>, Haddad Elie<sup>1,5</sup>, Sartelet Hervé<sup>1,2</sup>.

1. Centre de recherche CHU Sainte-Justine Montréal Canada
2. Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal, Montréal.
3. Département de chirurgie CHU Sainte-Justine Montréal, Canada
4. Département d'oncologie pédiatrique, CHU sainte Justine Montréal, Canada
5. Département de pédiatrie et de microbiologie-immunologie, Université de Montréal, Montréal, Canada

**Corresponding author:** Hervé Sartelet, Department of pathology, CHU Sainte-Justine

**abbreviated title :** Tumour Initiating Cells in neuroblastoma

**Keywords:** neuroblastoma, tumor initiating cells, genotype analysis, CD133, SNP



### Abstract

Neuroblastoma (NB) is the most common and lethal extracranial solid tumor of childhood. Despite aggressive therapy, more than half of the children with advanced NB will die of uncontrolled metastatic disease. After chemotherapy, tumor initiating cells (TICs) could persist, cause relapses and metastasis. The aim of this study is to demonstrate the tumor-initiating properties of CD133<sup>high</sup> NB cells and to identify new specific genetic abnormalities. An isolation of CD133<sup>high</sup> cell population of NB cell lines was done followed by neurospheres formation, soft agar assays and orthotopic injections in NOD/SCID/IL2R $\gamma$ c-null mice. A differential genotyping analysis was realized with Affymetrix SNP 6.0 arrays on CD133<sup>low</sup> and CD133<sup>high</sup> populations and the frequency of the abnormalities of 36 NB tumors was determined. Our results showed that CD133<sup>high</sup> NB cells possessed tumor-initiating properties since CD133<sup>high</sup> cells formed significantly more neurospheres, produced significantly more frequent colonies in soft agar than CD133<sup>low</sup>. 500 CD133<sup>high</sup> cells were sufficient to develop primary tumors and frequent metastases in mice model. Differential genotyping analysis demonstrated two common regions with gains (16p13.3 and 19p13.3) containing the gene *EFNA2* in the CD133<sup>high</sup> population and two LOH (16q12.1 and 21q21.3) in the CD133<sup>low</sup> population. The gain of *EFNA2* is correlated with the increased expression of the corresponding protein. These abnormalities were found in NB of patients and some were significantly correlated with CD133 expression. Our results show that CD133<sup>high</sup> NB cells have TICs properties and present different genotyping characteristics compared to CD133<sup>low</sup> cells. Our findings give insights for new therapeutic targets in NB TICs.

## Introduction

Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid tumor of childhood and accounts for 8-10% of all childhood tumors (London et al., 2005). NB is a tumor of the sympathetic nervous system and arises typically in the adrenal medulla or paraspinal ganglia, it can also present as mass lesions in the neck, chest, abdomen, or pelvis (Maris, 2010). Median age at diagnosis is 17 months (London et al., 2005). This malignant tumor is enigmatic and unpredictable because it exhibits a broad spectrum of clinical features, including spontaneous regression or maturation without any treatment or progression to metastasis leading to death (Maris et al., 2005). Age at diagnosis is one of the major prognosis factor; children younger than 18 months with localized tumors have favorable outcomes compared to children over 18 months who present metastatic disease and have 40-60% survival rate despite combined an aggressive therapy. (Modak and Cheung 2010; Perez et al., 2000). Almost 40% of all NBs are classified as high-risk NBs, based on age at the time of diagnosis ( $\geq 18$  months), stage, unfavorable histopathology, ploidy, and amplification of the MYCN oncogene. The high-risk NB is one of the greatest challenges in pediatrics (Yu et al., 2010). Among biological prognostic factors, MYCN amplification is found in 25% of primary NBs and is strongly correlated with advanced-stage, rapid disease progression, and poor clinical outcome (Ishola and Chung, 2007). Also, cytogenetics studies have described that loss of heterozygosity (LOH) on chromosome 1p36 as well as on 11q23 occurred in >70% of tumors. These LOH are associated to a poor clinical prognosis (Brodeur et al., 1981; Gilbert et al., 1982).

Until recently, conventional chromosome analysis and metaphase or interphase fluorescent in situ hybridization (FISH), and comparative genomic hybridization (CGH) were the main

methods for genome-wide detection of chromosomal imbalances in cytogenetics (Carr et al., 2007). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) arrays allow to determine both the copy number status and the genotype of close to a million SNPs, detecting region gains/losses and the presence of loss-of-heterozygosity in a single assay. Previous research demonstrated a genome-wide analysis of 92 NBs performed with SNP 50 K and/or 250 K gene chip arrays which provided both copy-number and allele-specific information at a resolution of 10-12 kb (Carén et al., 2008). High resolution oligonucleotide array platforms with millions of markers have enabled the study of copy number variation (CNV). CNVs are alterations of the genome in which small segments of DNA sequence are duplicated (gained) or deleted (lost) (Pique-Regi et al., 2010). Originally designed for genetic association studies, SNP arrays can also be used for the detection of whole or partial chromosomal gains and losses, and LOH (Carr et al., 2007).

Many lines of evidence strongly suggest that many if not all tumors contain a small number of cancer stem cells or tumor-initiating cells (TICs) that fuel tumor growth and seed metastases (Frank et al., 2010; Ward and Dirks, 2007). They are distinct from the bulk of the tumor because they are responsible for long-term maintenance of tumor growth in several cancers, that is to say that they have an important role in tumorigenesis, progression, metastasis and relapse (Dalerba et al., 2007). Mounting data over recent years have indicated the existence of TICs in multiple solid tumors (Mullassery et al., 2009). The poor prognosis for high-risk NB patients is associated with common disease recurrences that fail to respond to available therapies. In this context, increasing evidences suggest that NB may contain TICs that may resist to treatment and contribute to tumor relapse and metastasis. New therapies that target the TICs may therefore prevent or treat tumor

recurrences. Different cell surface markers have already proved useful in the isolation of TICs. First recognized as a surface marker for haematopoietic stem cells, CD133 (prominin 1) is a 120 kDa transmembrane glycoprotein that marks TICs in different types of brain tumors (including glioblastoma, medulloblastoma and ependymoma), pancreatic and colorectal carcinomas, and Ewing's sarcoma (Visvader and Lindeman, 2008).

It has recently been described, in NB, that CD133 appears to be a marker of TICs since isolated CD133 high cells were able to grow as neurospheres in vitro and to initiate tumors in athymic mice after their subcutaneous (ectopic) injection (Mahller et al., 2009). Recently, it has been demonstrated that CD133 regulates differentiation and proliferation in NB (Takenobu et al., 2011). However, the gold-standard for evaluating the presence of TICs is orthotopic transplantation of few sorted cells in immunocompromised mice (Visvader and Lindeman, 2008). Furthermore, the biology and genotypic characteristics of CD133-expressing NB TICs are still less understood. The high complexity and heterogeneity of NB suggest that NB TICs may contain different genotypic features than the bulk tumor cells. The aim of our study is to demonstrate that CD133 is a marker of TICs using the classical experiments such as neurospheres assay, colonies formation in soft agar, as well as orthotopic transplantation of cells into the adrenal gland of immunocompromised mice (Al-Hajj et al., 2003; Hamburger and Salmon, 1977; Jordan et al., 2006). In addition, genetic abnormalities in NB TICs will be analyzed.

## Materials and Methods

### *Cell lines*

NB-10 cells came from St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN, USA) and they derive from liver metastasis. SK-N-SH, SK-N-DZ and SK-N-FI cells were obtained from the American Type Culture Collection and originate from bone marrow metastases. IGR-N91 and IGR-NB8 cells were from Gustave Roussy Institute (Villejuif, France). IGR-N91 and IGR-NB8 cells come from bone marrow metastasis. NB-10, SK-N-DZ, IGR-N91 and IGR-NB8 have the *MYCN* amplification. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere composed of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> and were grown in Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 µg/mL gentamicin and 10% fetal bovine serum (FBS).

### *Patients*

According to specific criteria (clinical follow-up, tumor size and quantity of DNA), 36 NB cases were selected for SNP genotyping. These patients were treated and followed at CHU Sainte-Justine (Montreal, Canada) between March 1994 and February 2009. All tumor samples were frozen at -80°C. Tumors were classified according to the International Neuroblastoma Staging System (INSS) (Brodeur et al., 1988). Among these 36 NB, 26 were fixed in 10% phosphate-buffered formalin and embedded in paraffin. A tissue microarray (TMA) was constructed using four 0.6 mm diameter representative NB tumor tissue cylinders transferred into a recipient paraffin block using a tissue-arrayer. This study

was approved by the ethic committee of CHU Sainte-Justine's. Investigators obtained informed consent and agreement from the patients (and their parents).

### ***Animals***

Female and male NOD/LtSz-scid/IL-2Rgamma null (NSG) mice (6-8 weeks old) were obtained from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA), bred in the animal facility under pathogen-free conditions and fed with autoclaved water and diet. Experiments were carried out under the conditions established by the Good Laboratory Practices for Animal Research institutional committee of CHU Sainte-Justine.

### ***Isolation of CD133<sup>high</sup> cell population***

NB cells lines were separated by the standard method for cell separation MACS® Column Technology (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA). The protocol provided by the manufacturer was followed. Briefly, cells were separated in MS column and were magnetically labeled with CD133/1 MicroBeads. The cell separation was obtained with a high-gradient magnetic field. Unlabeled cells (CD133<sup>low</sup>) were collected and labeled cells (CD133<sup>high</sup>) were obtained with the retirement of the magnetic field. After labeling with allophycocyanin (APC)-conjugated anti-human CD133/2 antibody (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), the specificity of the selection of sorted CD133<sup>high</sup> cells was evaluated by flow cytometry with the FACS Calibur™ (Beckman Dickinson, San Jose, CA, USA). In the six cell lines, the percentage of cells expressing CD133 in CD133<sup>low</sup> was from 3 to 22% and from 57 to 96% in CD133<sup>high</sup>. The cut-off which allows to consider the cells sorted was more than 50% of cells expressing CD133 for CD133<sup>high</sup> and less than 25% for CD133<sup>low</sup>. In CD133<sup>high</sup> cells, the percentage of cells expressing CD133 was at least three times higher than in CD133<sup>low</sup>.

### ***Neurosphere formation assays***

2,5x10<sup>4</sup> selected NB cells (CD133<sup>high</sup> and CD133<sup>low</sup>) were plated in a proliferating medium containing DMEM/F12 (+ Glutamax) (3:1) (GIBCO® Invitrogen) supplemented with 1%

Penicillin/Streptomycin, 1 µg/ml Fungizone, 2% B27 supplement, 20 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF) and 25 ng/ml Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2). Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere composed of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> for 1-2 weeks. Neurospheres were imaged with an Olympus Q Color 3 camera mounted to a light microscope.

### ***Colony formation assays***

5x10<sup>3</sup> selected NB cells (CD133<sup>high</sup> and CD133<sup>low</sup>) were plated as single cell suspensions in 0.35% Agar (SIGMA, St-Louis, MO, USA) in DMEM supplemented with 10% FBS. Cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere composed of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> for 3-4 weeks and macroscopic colony formation appeared. Visual count of macroscopic colonies was done.

### ***NB orthotopic xenograft***

CD133<sup>high</sup> and CD133<sup>low</sup> SK-N-DZ cells (500 cells re-suspended in 20 µL of Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) were injected into the left adrenal gland of respectively 6 and 5 NSG mice under general anesthesia with 2% isofluran/O<sub>2</sub>. A clinical analysis (weight, vital signs and behavior) was done once a week. After 2 months, mice were sacrificed in a CO<sub>2</sub> chamber. A necropsy was done and the left adrenal gland (injection site) as well as liver, lungs, brain and femur (potential sites of metastasis) were removed and fixed in 10% phosphate-buffered formalin and embedded in paraffin.

### ***Histopathologic and immunohistochemistry studies***

From paraffin blocks, sections were cut at 5 µm and stained with hematoxylin, Phloxine and saffron (HPS). Immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded sections using Ultraview Universal DAB detection kit (Ventana, Ventana medical system, Tuscon, AR). For mice organs and tumors an antibody against CD56 (1/100, rabbit polyclonal, S473-r, Santa Cruz biotechnology, CA) and for TMA an antibody against CD133 (1/200, mouse monoclonal, 32AT1672 Santa Cruz biotechnology, CA) were applied for 32 min. It was followed by application of Ultraview Universal DAB detection kit (Ventana, Ventana

medical system, Tuscon AR). DAB was used as a chromogen and hematoxylin as counterstains. Normal mouse or rabbit IgG at the same concentrations as the primary antibodies served as negative controls.

### ***DNA extraction***

DNA extraction of NB cells (CD133<sup>high</sup> and CD133<sup>low</sup>) and of 36 tumors was performed with QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. The quality of DNA samples was verified with 1.5% agarose gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. DNA concentration was assessed with absorbance at 260 nm using a microplate spectrophotometer Spectra MAX 190 (Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA).

### ***Preparation of DNA target and SNP genotyping***

The Affymetrix® Genome-Wide Human SNP Array 6.0, that contains more than 906 600 SNPs and more than 946 000 probes for the detection of copy number variation was used for the genotyping, according to the methods described by the supplier. Briefly, 500 ng of genomic DNA was digested with appropriate restriction enzymes (Nsp I and Sty I) and ligated to adaptors that recognize the cohesive 4 bp overhangs. For each sample, the ligated DNA fragments were PCR amplified under recommended conditions, using a generic primer that recognizes the adaptor sequence. The PCR products for each restriction enzyme digest are combined and purified using polystyrene beads. The amplified DNA is then fragmented, labeled and hybridized to a Genome-Wide Human SNP Array 6.0. The hybridized SNP chips was then washed, incubated with Streptavidin Phycoerythrin (SAPE), and stained with a biotinylated anti-streptavidin phycoerythrin antibody. The chips were scanned with a GeneChip Scanner 3000 7G (Bedford, UK) according to the manufacturer's recommendations. The Affymetrix software Genotyping Console (GTC 4.0) was used to change unprocessed data to a file (.CHP) that can be read. The software Chromosome Analysis Suite (ChAS) was then used to examine the SNP hybridization patterns in each cell line and their corresponding matched controls. In order to identify potential genes of



interest, the anomaly had to be present in at least 50% of the NB cell lines and has to have a material gain or loss in the CD133<sup>high</sup> or CD133<sup>low</sup> NB population.

### ***Protein extraction and Western blotting***

For the protein extraction, selected NB pellets were resuspended in 500 µl of lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride), incubated 30 minutes at 4 °C to obtain cell lysates, and then assayed after 1 hour of incubation with the NB selected (CD133<sup>high</sup> and CD133<sup>low</sup>) samples and the reagent Micro BCA<sup>TM</sup> (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) at 60°C. After, equal amounts of protein (20 µg) from selected NB cell lysates were solubilized in Laemmli sample buffer, boiled for 5 minutes, separated by SDS-PAGE, transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes and blocked 1 h at room temperature with TBS buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) containing 3% bovine serum albumin (BSA), and incubated with primary antibody overnight at 4 °C. A step of washing PVDF membranes four times in TBS buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl) containing 0.1% Tween is done. Immunoreactive bands were revealed following 1 hour incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies, and the signals were visualized with an ECL detection system (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). The primary antibodies used for this study were against ephrin-A2 1/500 (ab65041, abcam) or β-actin 1/3000 (sc-69879, Santa Cruz Biothechnology).

### ***Statistical analysis***

All statistical analyzes was done using Student's t-test and Chi-square test with Graphpad Prism software. P < 0.05 was considered statistically significant.

## Results

### CD133 is a TIC marker in neuroblastoma

In order to evaluate the tumor-initiating properties of CD133<sup>high</sup> cell population, the cells were selected using CD133 magnetic beads prior to being assessed for neurospheres and colony forming assays which are known to successfully discriminate TICs from the bulk of tumor cells. As shown in Fig.1A, CD133<sup>high</sup> cells formed significantly higher neurospheres than their counterpart CD133<sup>low</sup> for NB-10 (p=0.0106), SK-N-DZ (p=0.0001) and SK-N-FI (p=0.0029). In addition, neurospheres coming from CD133<sup>high</sup> cells could be maintained for several serial passages, suggesting that they are capable of self-renewal (data not shown). The neurospheres coming from CD133<sup>low</sup> cells have rapidly degenerated. Similarly, CD133<sup>high</sup> population formed significantly more frequent colonies in soft agar than CD133<sup>low</sup> population in SK-N-DZ (p=0.0102), SK-N-SH (p=0.0283), NB-10 (p=0.0458) and IGR-N91 (p=0.0041) (Fig.1B). No size difference was reported. These results indicate that CD133<sup>high</sup> show tumor-initiating features *in vitro*.

At necropsy, large tumors were observed in 83.3% (5/6) of adrenal glands of the NSG mice injected orthotopically with 500 CD133<sup>high</sup> cells (Fig.2A and B, Table 1). The concomitant histological and immunohistochemical analysis confirmed the presence of primary tumors (Fig.2D) and frequent metastases (lung 66.7% (4/6), liver 50% (3/6) and bone marrow 50% (3/6)) (Fig.2E-G, Table 1). Microscopic analysis showed that all tumors were comprised of sheets and cords of small undifferentiated cells which is typical of NB (Fig.2D). No sign of differentiation (neuropil, ganglion cell) was identifiable. CD56 immunohistochemistry analysis confirmed the presence of micro metastasis (Fig.2G). On the other hand, mice injected with 500 CD133<sup>low</sup> cells revealed no primary tumors or metastases (Fig.2C).

### Differential genotypic analysis of NB cells expressing CD133

To determine whether CD133<sup>high</sup> NB TICs exhibit genetic characteristics distinct from the CD133<sup>low</sup> cells, we performed genotypic analyzes on these two populations using the Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0. Genetic differences between CD133<sup>high</sup> and CD133<sup>low</sup> cells were reported in at least 50% of NB cells lines (Fig.3A and B and

Fig.4A and B). As shown in Fig.3, chromosomes 16 (16p13.3) and 19 (19p13.3 and 19q13.33) of the CD133<sup>high</sup> NB cells, but not their counterpart CD133<sup>low</sup>, exhibited small regions of 18 to 176 Kbp of segmental chromosomal gains (regions A to F). Interestingly, segmental chromosomal gains observed in CD133<sup>high</sup> NB TICs contained genes encoding for proteins involved in neurogenesis and neuron physiology (*CIQTNF8* (Peterson et al. 2009), *CACNA1H* (Asaga et al., 2006; Chemin et al., 2004; Gackière et al., 2008; Lehtinen et al. 2011), *MIDN* (Tsukahara et al., 2000; Zielak et al., 2008), *CIRBP* (Artero-Castro et al., 2009; Lleonart, 2010; Nishiyama et al., 1997; Saito et al., 2010; Zeng et al., 2009) and *EFNA2* (Aasheim et al., 1998; Feng et al., 2010; Fox and Kandpal, 2004; Genander and Frisén, 2010), and others that encode for proteins involved in inflammatory diseases *TPSB2* (Trivedi et al., 2009), *TPSAB1* (Fukuoka and Schwartz, 2007) and *TPSD1* (Wang et al., 2002). We also observed two genes that are involved in DNA damage repair (*GAMT* (Hansel et al., 2004; Ide et al., 2009) and *PNKP* (Freschauf et al., 2009)). Other genes have been observed in CD133<sup>high</sup> NB TICs that encode for protein functions, such as hormone secretion (*SSTR5*) (de Sá et al., 2006), tumor suppressor (*STK11* or named *LKB1*) (Fernandez et al., 2004), ATP synthesis (*ATP5D*) (Chu and Peters, 2008), electron transfer (*NDUFS7*) (Pagniez-Mammeri et al., 2009), protein transport (*AP2A1*) (Nakatsu and Ohno, 2003), embryonic development (*FUZ*) (Heydeck et al., 2009), regulation of retinoic acid (*MED25*) (Youn et al., 2011) and cell proliferation (*PTOV1*) (Fernández et al., 2011) (Table 2).

Moreover, our genotypic analysis revealed the presence of two chromosomal regions showing LOH only in the CD133<sup>low</sup> population. As shown in Fig.4, chromosomes 16 (16q12.1) and 21 (21q21.3) of the CD133<sup>low</sup> NB cells demonstrated regions of 1 958 and 507 Kbp of segmental chromosomal LOH (regions G and H). It is interesting to note that segmental chromosomal LOH observed in CD133<sup>low</sup> NB cells contained genes encoding for proteins involved in cell cycle progression and DNA replication (*SHCBP1* (Schmandt et al., 1999), *ORC6* (Killian et al., 2004; Prasanth et al., 2002), *USP16* (Joo et al., 2007) and *CCT8* (Mukherjee et al., 2010), other proteins involved in drug resistance, such as *ABCC11* and *ABCC12* (Bortfeld et al., 2006; Guo et al., 2009) and in gluconeogenesis (*GPT2* (Glinghammar et al., 2009) and *PHKB* (Pallen, 2003)). Other genes that have been

characterized in CD133<sup>low</sup> NB cells encode for protein functions, such as transport of sortilin (*VPS35*) (Kim et al., 2010), sarcomere assembly (*MYLK3*) (Min et al., 2010), co-chaperone (*DNAJA2*) (Walker et al., 2010), neurogenesis (*NETO2*) (Calicchio et al., 2009), quality of proteins (*LONP2*) (Minami et al., 2011), cell-cell interactions (*ITFG1*) (Banères et al., 2000) and cancer progression (*SLAH1*) (Liu et al., 2008; Matsuo et al., 2003; Wen et al., 2010) (Table 3).

#### **Correlation between the genetic abnormalities found in CD133 cells and the patient's tumors**

The clinical features of the patients are described in Table 4. Among the 36 tumors studied, 9 (25%) presented a gain of 19p13, 6 (17%) a gain of 19q13, 15 (41.6%) a gain of 16p13 and 17 (47%) a LOH of 16q12. No significant correlation was found between these genetic abnormalities and clinical prognosis factors (Age at diagnosis, INSS stage, survival).

Among the 26 tumors studied in TMA, 9 (34%) contained cells which had a membranous expression of CD133. There was significant correlation between the presence of a gain of 16p13 and the expression of CD133 ( $p=0.048$ ). Moreover, the absence of CD133 in the tumor was significantly correlated with the presence of LOH 16q12 ( $p=0.01$ ).

#### **Differential expression of EFNA2 protein**

Among all genes with abnormalities found in the genotyping analysis, *EFNA2* present a great interest because it is commonly expressed in adult stem and neural stem/progenitor cells and its expression is frequently modified in tumors when compared to the tissue of origin (Genander and Frisén, 2010). Also, we observed a correlation between CD133 and *EFNA2* expressions in two selected NB cell lines (SK-N-DZ and N91) (Fig.5) which presented a gain of this gene in genotype analysis.

## Discussion

Results presented in this study demonstrate that NB cells expressing CD133 exhibit stemness and TICs properties. The first observation indicating this fact is the formation of neurospheres in the CD133<sup>high</sup> cell population. Actually, there was a significant increase in the number of neurospheres formed as compared to their counterpart CD133<sup>low</sup>. Neurospheres forming assay has been widely used in numerous studies to identify adult stem cells and TICs in vitro. It was shown that TICs from glioblastomas proliferate on non-adherent surfaces and therefore generate neurospheres-like spherical cellular aggregates (Li et al. 2011). It has also been demonstrated that these neurospheres have the capacity of self-renewal (Seaberg and van der Kooy, 2003). Moreover, neurospheres formed by CD133<sup>high</sup> NB cells are larger in size than those generated from CD133<sup>low</sup>, and can undergo serial cell passages suggesting that neurospheres formed by CD133<sup>high</sup> cells originate from stem cells; while smaller neurospheres CD133<sup>low</sup> may result from progenitor cells (Pastrana et al., 2011). We also observed a significant increase of colonies originating from CD133<sup>high</sup> NB cells grown under anchorage-independent conditions. Anchorage-independent growth is considered one of the most rigorous tests to detect malignant cell transformation. Furthermore, we observed formation of tumors when as few as 500 CD133<sup>high</sup> SK-N-DZ cells were injected orthotopically into the adrenal gland, unlike their counterpart CD133<sup>low</sup> which formed no tumors. Our study is the first to demonstrate that orthotopic injection of as few as 500 CD133<sup>high</sup> TICs can develop into primary tumors and metastases to the lung, liver and bone marrow. Several studies showing the behavior of TICs in xenotransplantation have been published in several human solid tumors, such as prostate,

colon, brain and neck, pancreas, lung, ovarian and bladder (Baiocchi et al., 2010). In addition, studies of TICs in xenografts using the CD133 marker to isolate the sub-population have already been done for some solid tumors. For example, TICs isolated from glioblastoma induced the initiation of tumors in the NOD/SCID mice and could be retransplanted demonstrating their self-renewal (Singh et al., 2004). All of these observations are consistent with previous findings that linked CD133 to NB TICs (Schiapparelli et al., 2010; Takenobu et al., 2011). In our study, we used cell lines instead of primary tumors because in primary tumors, tumoral cells are frequently associated with stromal cells. These cells could also modify the results of genotype analysis. Indeed, it has been shown that normal elements found in these tumors can contaminate and misrepresent the determination of copy number variations and LOH (Volchenboum et al., 2009).

A differential genotyping analysis was performed on the entire genome in order to have a global view on the genetic alterations found in CD133<sup>high</sup> and CD133<sup>low</sup> populations. We first observed small regions of segmental chromosomal gains on 16p13.3, 19p13.3 and 19q13.33 in CD133<sup>high</sup> population that were not observed in CD133<sup>low</sup>. These abnormalities were infrequent in patient's tumor with respectively 41.6%, 25% and 17% of them presenting these gains. Interestingly, the presence of CD133 in tumors was significantly correlated with gain of 16p13.3. In a study with 10K SNP arrays, concerning 22 patients with high-risk neuroblastoma, a gain of 19p was found in about 5 % of cases (George et al. 2007). Among the genes included in these regions, those encoding for the cold-inducible mRNA binding protein and ephrin-A2 (CIRBP and EFNA2, respectively) are of great interest regarding the tumor-initiating properties of CD133<sup>high</sup> NB cells. Indeed, it has been demonstrated that stimulation of CIRBP prevented cell apoptosis (Saito et al., 2010). When

CIRBP is up-regulated, it activates the ERK1/2 signaling pathway which may critically contribute to tumorigenesis. CIRBP mRNA is also up-regulated by 36% in prostate and by 35% in colon cancer patients (Artero-Castro et al., 2009). Moreover, CIRBP is involved in angiogenesis by its increasing levels during hypoxic conditions in a manner similar to that of vascular endothelial growth factor (VEGF), which is a well-known HIF-1 target (Lleonart, 2010). Another team demonstrated that down-regulation of CIRBP in prostate cancer cells modifies the survival of cancer cell by enhancing chemosensitivity (Zeng et al., 2009). Hence, up-regulation of CIRBP in CD133<sup>high</sup> NB cells may contribute to their tumor-initiating features by promoting NB growth and resistance to chemotherapy.

EFNA2, which is an Ephrin receptor/Ephrin family that is related to neural development, is the second interesting gene that may play a role in cancer development (Davenport et al. 1998). Recently, it has been shown that EFNA2 mRNA is up-regulated in hepatocellular carcinoma (HCC) and in some breast cancer cell lines, suggesting that it may likely play a role in tumor formation and invasiveness (Feng et al., 2010; Fox and Kandpal 2004). It has been shown that Ephrins and their receptors are commonly expressed in adult stem cell but also in neural stem/progenitor cells and moreover they are promoting tumorigenesis (Genander and Frisén, 2010). In our study, we demonstrated that the expression of EFNA2 protein was correlated with expression of CD133 in agreement with the gain of its gene expression detected by genotype analysis in CD133<sup>high</sup> cells. Based on these findings, it is tempting to speculate that this Ephrin could be favorable to the survival and tumorigenicity of NB TICs, since our data indicate a gain EFNA2.

Our analysis also highlighted the presence of LOH (16q12.1 and 21q21.3) only in CD133<sup>low</sup> population. Moreover the LOH 16q12 seem to be frequent in patient's tumors (47%) and

was significantly correlated to the absence of CD133. In patients or in cell lines, LOH 16q were described in rare NB (George et al. 2007; Carr et al., 2007). The origin recognition complex subunit 6 (ORC6), which is involved in multiple aspects of the cell division cycle, has been shown to alter chromosomal segregation in experimental models and could therefore contribute to the aneuploidy observed in tumors (Prasanth et al., 2002). In addition, ORC6 was involved in ribosome biogenesis and their alteration may directly cause chromosomal instability which contributes to malignant transformation and tumoral progression by promoting oncogene activation (Killian et al., 2004) (Lengauer et al., 1998). Moreover, ORC6 down regulation sensitizes colon cancer cells to both 5-Fluorouracil and cisplatin treatments (Gavin et al., 2008). This LOH observed in CD133<sup>low</sup> population can explain the chemosensitivity of the tumor bulk cells compared to the more resistant TICs. Furthermore, LOH of the ATP binding cassette (ABC) transporters, which were shown to be involved in the multidrug resistant phenotype of cancer cells, was also observed providing an understanding for the decreased resistance of the NB bulk cells compared to TICs during chemotherapy treatments (Borst et al. 1999). The only genomic study on CD133<sup>high</sup> cell lines was done on colorectal cancer cells. The study used array comparative genomic hybridization (aCGH) to highlight differential expression of 96 genes between CD133<sup>high</sup> and CD133<sup>low</sup> populations (Gaiser et al., 2011).

Overall, our results indicate that NB cells expressing the surface marker CD133 show tumor-initiating properties. Interestingly, these NB TICs harbor a different genetic profile than the bulk of tumor cells in NB cell lines and in NB tumors. The genotypic characterization of these TICs should help in the identification of new targets in particular EFNA2 for the development of more efficient therapies in the treatment of NB.



**Acknowledgments:** This work was supported by The Fondation Charles-Bruneau, the Fondation du CHU Sainte-Justine and The Fondation Leucan.

## References

- Aasheim HC, Pedeutour F, Grosgeorge J, Logtenberg T. 1998. Cloning, chromosomal mapping, and tissue expression of the gene encoding the human Eph-family kinase ligand ephrin-A2. *Biochem Biophys Res Commun* 252:378-82.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3983-8.
- Artero-Castro A, Callejas FB, Castellvi J, Kondoh H, Carnero A, Fernández-Marcos PJ, Serrano M, Ramón y Cajal S, Lleónart ME. 2009. Cold-inducible RNA-binding protein bypasses replicative senescence in primary cells through extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation. *Mol Cell Biol* 29:1855-68.
- Asaga S, Ueda M, Jinno H, Kikuchi K, Itano O, Ikeda T, Kitajima M. 2006. Identification of a new breast cancer-related gene by restriction landmark genomic scanning. *Anticancer Res* 26:35-42.
- Baiocchi M, Biffoni M, Ricci-Vitiani L, Piloizzi E, De Maria R. 2010. New models for cancer research: human cancer stem cell xenografts. *Curr Opin Pharmacol* 10:380-4.
- Banères JL, Roquet F, Martin A, Parello J. 2000. A minimized human integrin  $\alpha(5)\beta(1)$  that retains ligand recognition. *J Biol Chem* 275:5888-903.
- Borst, P, Evers R, Kool M, Wijnholds J. 1999. The multidrug resistance protein family. *Biochim Biophys Acta* 1461:347-57.
- Bortfeld M, Rius M, König J, Herold-Mende C, Nies AT, Keppler D. 2006. Human multidrug resistance protein 8 (MRP8/ABCC11), an apical efflux pump for steroid sulfates, is an axonal protein of the CNS and peripheral nervous system. *Neuroscience* 137:1247-57.
- Brodeur GM, Green AA, Hayes FA, Williams KJ, Williams DL, Tsatis AA. 1981. Cytogenetic features of human neuroblastomas and cell lines. *Cancer Res* 41:4678-86.
- Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, Berthold F, Castleberry RP, D'Angio G, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Freeman AI. 1988. International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 6:1874-81.

- Calicchio ML, Collins T, Kozakewich HP. 2009. Identification of signaling systems in proliferating and involuting phase infantile hemangiomas by genome-wide transcriptional profiling. *Am J Pathol* 174:1638-49.
- Carr J, Bown NP, Case MC, Hall AG, Lunec J, Tweddle DA. 2007. High-resolution analysis of allelic imbalance in neuroblastoma cell lines by single nucleotide polymorphism arrays. *Cancer Genet Cytogenet* 172:127-38.
- Chemin J, Nargeot J, Lory P. 2004. Ca(v)3.2 calcium channels control an autocrine mechanism that promotes neuroblastoma cell differentiation. *Neuroreport* 15:671-5.
- Chu TJ, Peters DG. 2008. Serial analysis of the vascular endothelial transcriptome under static and shear stress conditions. *Physiol Genomics* 34:185-92.
- Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. 2007. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 58:267-84.
- Davenport RW, Thies E, Zhou R, Nelson PG. 1998. Cellular localization of ephrin-A2, ephrin-A5, and other functional guidance cues underlies retinotopic development across species. *J Neurosci* 18:975-86.
- De Sá SV, Corrêa-Giannella ML, Machado MC, De Souza JJ, Pereira MA, Patzina RA, Siqueira SA, Giannella-Neto D. 2006. Somatostatin receptor subtype 5 (SSTR5) mRNA expression is related to histopathological features of cell proliferation in insulinomas. *Endocr Relat Cancer* 13:69-78.
- Feng YX, Zhao JS, Li JJ, Wang T, Cheng SQ, Yuan Y, Wang F, Wang XF, Xie D. 2010. Liver cancer: EphrinA2 promotes tumorigenicity through Rac1/Akt/NF-kappaB signaling pathway 120:. *Hepatology* 51:535-44.

Fernandez P, Carretero J, Medina PP, Jimenez AI, Rodriguez-Perales S, Paz, MF, Cigudosa JC, Esteller M, Lombardia L, Morente M, Sanchez-Verde L, Sotelo T, Sanchez-Cespedes M. 2004. Distinctive gene expression of human lung adenocarcinomas carrying LKB1 mutations. *Oncogene* 23:5084-91.

Fernández S, Mosquera JL, Alaña L, Sanchez-Pla A, Morote J, Ramón Y Cajal, S, Reventós J, de Torres I, Paciucci R. 2011. PTOV1 is overexpressed in human high-grade malignant tumors. *Virchows Arch* 458:323-30.

Fox BP, Kandpal RP. 2004. Invasiveness of breast carcinoma cells and transcript profile: Eph receptors and ephrin ligands as molecular markers of potential diagnostic and prognostic application. *Biochem Biophys Res Commun* 318:882-92.

Frank NY, Schatton T, Frank MH. 2010. The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *J Clin Invest* 120:41-50.

Freschauf G, Karimi-Busheri F, Ulaczyk-Lesanko A, Mereniuk TR, Ahrens A, Koshy JM, Rasouli-Nia A, Pasarij P, Holmes CF, Rininsland F, Hall DG, Weinfeld M. 2009. Identification of a small molecule inhibitor of the human DNA repair enzyme polynucleotide kinase/phosphatase. *Cancer Res* 69:7739-46.

Fukuoka Y, Schwartz LB. 2007. Active monomers of human beta-tryptase have expanded substrate specificities. *Int Immunopharmacol* 7:1900-8.

Gackière F, Bidaux G, Delcourt P, Van Coppenolle F, Katsogiannou M, Dewailly E, Bavencoffe A, Van Chuoï-Mariot MT, Mauroy B, Prevarskaya N, Mariot P. 2008. CaV3.2 T-type calcium channels are involved in calcium-dependent secretion of neuroendocrine prostate cancer cells. *J Biol Chem* 283:10162-73.

Gaiser T, Camps J, Meinhardt S, Wangsa D, Nguyen QT, Varma S, Dittfeld C, Kunz-Schughart LA, Kemmerling R, Becker MR, Heselmeyer-Haddad K, Ried T. 2011. Genome

and transcriptome profiles of CD133-positive colorectal cancer cells. *Am J Pathol* 178:1478-88.

Gavin EJ, Song B, Wang Y, Xi Y, Ju J. 2008. Reduction of Orc6 expression sensitizes human colon cancer cells to 5-fluorouracil and cisplatin. *PLoS One* 3:e4054.

Genander M, Frisén J. 2010. Ephrins and Eph receptors in stem cells and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 22:611-6.

Gilbert F, Balaban G, Moorhead P, Bianchi D, Schlesinger H. 1982. Abnormalities of chromosome 1p in human neuroblastoma tumors and cell lines. *Cancer Genet Cytogenet* 7:33-42.

Glinghammar B, Rafter I, Lindström AK, Hedberg JJ, Andersson HB, Lindblom P, Berg AL, Cotgreave I. 2009. Detection of the mitochondrial and catalytically active alanine aminotransferase in human tissues and plasma. *Int J Mol Med* 23:621-31.

George, R. E., Attiyeh, E. F., Li, S., Moreau, L. A., Neuberg, D., Li, C., Fox, E. A., Meyerson, M., Diller, L., Fortina, P., Look, A. T. and Maris, J. M. 2007. Genome-wide analysis of neuroblastomas using high-density single nucleotide polymorphism arrays. *PLoS One* 2:e255.

Guo Y, Köck K, Ritter CA, Chen ZS, Grube M, Jedlitschky G, Illmer T, Ayres M, Beck JF, Siegmund W, Ehninger G, Gandhi V, Kroemer HK, Kruh GD, Schaich, M. 2009. Expression of ABCC-type nucleotide exporters in blasts of adult acute myeloid leukemia: relation to long-term survival. *Clin Cancer Res* 15:1762-9.

Hamburger AW, Salmon SE. 1977. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197:461-3.

Hansel DE, Rahman A, House M, Ashfaq R, Berg K, Yeo CJ, Maitra A. 2004. Met proto-oncogene and insulin-like growth factor binding protein 3 overexpression correlates with metastatic ability in well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms. *Clin Cancer Res* 10:6152-8.

Heydeck W, Zeng H, Liu A. 2009. Planar cell polarity effector gene Fuzzy regulates cilia formation and Hedgehog signal transduction in mouse. *Dev Dyn* 238:3035-42.

Ide T, Brown-Endres L, Chu K, Ongusaha PP, Ohtsuka T, El-Deiry WS, Aaronson SA, Lee SW. 2009. GAMT, a p53-inducible modulator of apoptosis, is critical for the adaptive response to nutrient stress. *Mol Cell* 36:379-92.

Ishola TA, Chung DH. 2007. Neuroblastoma. *Surg Oncol* 16:149-56.

Joo HY, Zhai L, Yang C, Nie S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Chang C, Wang H. 2007. Regulation of cell cycle progression and gene expression by H2A deubiquitination. *Nature* 449:1068-72.

Jordan CT, Guzman ML, Noble M. 2006. Cancer stem cells. *N Engl J Med* 355:1253-61.

Killian A, Le Meur N, Sesboué R, Bourguignon J, Bougeard G, Gautherot J, Bastard C, Frébourg T, Flaman J. M. 2004. Inactivation of the RRB1-Pescadillo pathway involved in ribosome biogenesis induces chromosomal instability. *Oncogene* 23:8597-602.

Kim E, Lee Y, Lee H J, Kim JS, Song BS, Huh JW, Lee SR, Kim SU, Kim SH, Hong Y, Shim I, Chang KT. 2010. Implication of mouse Vps26b-Vps29-Vps35 retromer complex in sortilin trafficking. *Biochem Biophys Res Commun* 403:167-71.

Lehtinen AB, Cox AJ, Ziegler JT, Voruganti VS, Xu J, Freedman BI, Carr JJ, Comuzzie, AG, Langefeld CD, Bowden DW. 2011. Genetic mapping of vascular calcified plaque loci

on chromosome 16p in European Americans from the diabetes heart study. *Ann Hum Genet* 75:222-35.

Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-9.

Li Y, Li A, Glas M, Lal B, Ying M, Sang Y, Xia S, Trageser D, Guerrero-Cázares H, Eberhart CG, Quiñones-Hinojosa A, Scheffler B, Lattera J. 2011. c-Met signaling induces a reprogramming network and supports the glioblastoma stem-like phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:9951-6.

Liu M, Aneja R, Wang H, Sun L, Dong X, Huo L, Joshi H, Zhou J. 2008. Modulation of multidrug resistance in cancer cells by the E3 ubiquitin ligase seven-in-absentia homologue 1. *J Pathol* 214:508-14.

Lleonart ME. 2010. A new generation of proto-oncogenes: cold-inducible RNA binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1805:43-52.

London WB, Castleberry R., Matthay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, Thorner P, Brodeur G, Maris JM, Reynolds CP, Cohn SL. 2005. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 23:6459-65.

Mahller YY, Williams JP, Baird WH, Mitton B, Grossheim J, Saeki Y, Cancelas JA, Ratner N, Cripe TP. 2009. Neuroblastoma cell lines contain pluripotent tumor initiating cells that are susceptible to a targeted oncolytic virus. *PLoS One* 4:e4235.

Maris JM. 2005. The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification. *Curr Opin Pediatr* 17:7-13.

Maris JM. 2010. Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* 362:2202-11.

- Matsuo K, Satoh S, Okabe H, Nomura A, Maeda T, Yamaoka Y, Ikai I. 2003. SIAH1 inactivation correlates with tumor progression in hepatocellular carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 36:283-91.
- Min KD, Asakura M, Liao Y, Nakamaru K, Okazaki H, Takahashi T, Fujimoto K, Ito S, Takahashi A, Asanuma H, Yamazaki S, Minamino T, Sanada S, Seguchi O, Nakano A, Ando Y, Otsuka T, Furukawa H, Isomura T, Takashima S, Mochizuki N, Kitakaze M. 2010. Identification of genes related to heart failure using global gene expression profiling of human failing myocardium. *Biochem Biophys Res Commun* 393:55-60.
- Minami N, Yasuda T, Ishii Y, Fujimori K, Amano F. 2011. Regulatory role of cardiolipin in the activity of an ATP-dependent protease, Lon, from *Escherichia coli*. *J Biochem* 149:519-27.
- Modak S, Cheung NK. 2010. Neuroblastoma: Therapeutic strategies for a clinical enigma. *Cancer Treat Rev* 36:307-17.
- Mukherjee K, Conway de Macario E, Macario AJ, Brocchieri L. 2010. Chaperonin genes on the rise: new divergent classes and intense duplication in human and other vertebrate genomes. *BMC Evol Biol* 10:64.
- Mullaserry D, Dominici C, Jesudason EC, McDowell HP, Losty PD. 2009. Neuroblastoma: contemporary management. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 94:177-85.
- Nakatsu F, Ohno H. 2003. Adaptor protein complexes as the key regulators of protein sorting in the post-Golgi network. *Cell Struct Funct* 28:419-29.
- Nishiyama H, Higashitsuji H, Yokoi H, Itoh K, Danno S, Matsuda T, Fujita J. 1997. Cloning and characterization of human CIRP (cold-inducible RNA-binding protein) cDNA and chromosomal assignment of the gene. *Gene* 204:115-20.



- Pagniez-Mammeri H, Lombes A, Brivet M, Ogier-de Baulny H, Landrieu P, Legrand A, Slama A. 2009. Rapid screening for nuclear genes mutations in isolated respiratory chain complex I defects. *Mol Genet Metab* 96:196-200.
- Pallen MJ. 2003. Glucoamylase-like domains in the alpha- and beta-subunits of phosphorylase kinase. *Protein Sci* 12:1804-7.
- Pastrana E, Silva-Vargas V, Doetsch F. 2011. Eyes wide open: a critical review of sphere-formation as an assay for stem cells. *Cell Stem Cell* 8:486-98.
- Perez CA, Matthay KK, Atkinson JB, Seeger RC, Shimada H, Haase GM, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN. 2000. Biologic variables in the outcome of stages I and II neuroblastoma treated with surgery as primary therapy: a children's cancer group study. *J Clin Oncol* 18:18-26.
- Peterson JM, Wei Z, Wong GW. 2009. CTRP8 and CTRP9B are novel proteins that hetero-oligomerize with C1q/TNF family members. *Biochem Biophys Res Commun* 388:360-5.
- Pique-Regi R, Cáceres A, González JR. 2010. R-Gada: a fast and flexible pipeline for copy number analysis in association studies. *BMC Bioinformatics* 11:380.
- Prasanth SG, Prasanth KV, Stillman B. 2002. Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis. *Science* 297:1026-31.
- Saito K, Fukuda N, Matsumoto T, Iribe Y, Tsunemi A, Kazama T, Yoshida-Noro C, Hayashi N. 2010. Moderate low temperature preserves the stemness of neural stem cells and suppresses apoptosis of the cells via activation of the cold-inducible RNA binding protein. *Brain Res* 1358:20-9.

- Schiapparelli P, Enguita-Germán M, Balbuena J, Rey JA, Lázcoz P, Castresana JS. 2010. Analysis of stemness gene expression and CD133 abnormal methylation in neuroblastoma cell lines. *Oncol Rep* 24:1355-62.
- Schmandt R, Liu SK, McGlade CJ. 1999. Cloning and characterization of mPAL, a novel Shc SH2 domain-binding protein expressed in proliferating cells. *Oncogene* 18:1867-79.
- Seaberg RM, Van der Kooy D. 2003. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci* 26:125-31.
- Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432:396-401.
- Takenobu H, Shimozato O, Nakamura T, Ochiai H, Yamaguchi Y, Ohira M, Nakagawara A, Kamijo T. 2011. CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification. *Oncogene* 30:97-105.
- Trivedi NN, Tamraz B, Chu C, Kwok PY, Caughey GH. 2009. Human subjects are protected from mast cell tryptase deficiency despite frequent inheritance of loss-of-function mutations. *J Allergy Clin Immunol* 124:1099-105.e1-4.
- Tsukahara M, Suemori H, Noguchi S, Ji ZS, Tsunoo H. 2000. Novel nucleolar protein, midnolin, is expressed in the mesencephalon during mouse development. *Gene* 254:45-55.
- Visvader JE, Lindeman GJ. 2008. Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8:755-68.
- Volchenboum SL, Li C, Li S, Attiyeh EF, Reynolds CP, Maris JM, Look AT, George RE. 2009. Comparison of primary neuroblastoma tumors and derivative early-passage cell lines using genome-wide single nucleotide polymorphism array analysis. *Cancer Res* 69:4143-9.

Walker VE, Wong MJ, Atanasiu R, Hantouche C, Young JC, Shrier A. 2010. Hsp40 chaperones promote degradation of the HERG potassium channel. *J Biol Chem* 285:3319-29.

Wang HW, McNeil HP, Husain A, Liu K, Tedla N, Thomas PS, Raftery M, King GC, Cai ZY, Hunt JE. 2002. Delta tryptase is expressed in multiple human tissues, and a recombinant form has proteolytic activity. *J Immunol* 169:5145-52.

Ward RJ, Dirks PB. 2007. Cancer stem cells: at the headwaters of tumor development. *Annu Rev Pathol* 2:175-89.

Wen YY, Yang ZQ, Song M, Li, BL, Yao XH, Chen XL, Zhao J, Lu YY, Zhu JJ, Wang EH. 2010. The expression of SIAH1 is downregulated and associated with Bim and apoptosis in human breast cancer tissues and cells. *Mol Carcinog* 49:440-9.

Youn HS, Park UH, Kim EJ, Um SJ. 2011. PTOV1 antagonizes MED25 in RAR transcriptional activation. *Biochem Biophys Res Commun* 404:239-44.

Yu AL, Gilman AL, Ozkaynak MF, London WB, Kreissman SG, Chen HX, Smith M, Anderson B, Villablanca JG, Matthay KK, Shimada H, Grupp SA, Seeger R, Reynolds CP, Buxton A, Reisfeld RA, Gillies SD, Cohn SL, Maris JM, Sondel PM, Group C.s.O. 2010. Anti-GD2 antibody with GM-CSF, interleukin-2, and isotretinoin for neuroblastoma. *N Engl J Med* 363:1324-34.

Zeng Y, KulkarniP, Inoue T, Getzenberg RH. 2009. Down-regulating cold shock protein genes impairs cancer cell survival and enhances chemosensitivity. *J Cell Biochem* 107:179-88.

Zielak AE, Canty MJ, Forde N, Coussens PM, Smith GW, Lonergan P, Ireland JJ, Evans, AC. 2008. Differential expression of genes for transcription factors in theca and granulosa cells following selection of a dominant follicle in cattle. *Mol Reprod Dev* 75:904-14.

### Table and Figure

**Table 1: Orthotopic transplantation in NOD/SCID/IL2R $\gamma$ c-null mice.**

	Number of engrafted cells	Primary tumor	Lung metastases	Liver metastases	Bone marrow metastases
CD133 <sup>low</sup>	500	0/5	0/5	0/5	0/5
CD133 <sup>high</sup>	500	5/6	4/6	3/6	3/6

**Table 2: Gain of genes in NB's cell lines CD133<sup>high</sup> population.**

Regions	Symbol	Gene name	Function
16p13.3			
Region A	LOC146336	unknown	Unknown
	SSTR5	Somatostatin receptor 5	Control of insulin and glucagon secretions, hormone secretion and cell proliferation
	C1QTNF8	C1q and tumor necrosis factor related protein 8	Immune, endocrine, skeletal, neuronal, reproductive, sensory, and vascular systems
	CACNA1H	Calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1H subunit	Extension of neurites during the neuroendocrine differentiation, exocytosis in acrosomal reaction or synaptic transmissions in neurons or chromaffin cells
	TPSB2	Tryptase beta 2	Involved in the pathogenesis of airway inflammation
	TPSAB1	Tryptase alpha/beta 1	Involved in the pathogenesis of airway inflammation
	TPSD1	Tryptase delta 1	Implicated in the development of a number of inflammatory diseases including asthma
19p13.3			
Region B	STK11	Serine/threonine kinase 11 or named LKB11	Cell polarity, tumor suppressor, Peutz-Jeghers syndrome, activate autophagy
Region C	C19orf26	Chromosome 19 open reading frame 26	Unknown
	ATP5D	ATP synthase, H <sup>+</sup> transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit	Involved in ATP synthesis
Region D	MIDN	Midnolin	Control of development via regulation mRNA transport in cells, involved in regulation of genes related to neurogenesis in the nucleus
	C19orf23	Chromosome 19 open reading frame 23	Unknown
	CIRBP	Cold-inducible mRNA binding protein	Stress response, plays the role of a survival factor in neural stem cells, protects cell against apoptosis, tumorigenesis, angiogenesis, protein synthesis, cell proliferation
Region E	EFNA2	Ephrin-A2	Control a diverse array of cell-cell interactions in the nervous and vascular systems, tumorigenesis
	NDUFS7	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein	Role in electron transfer and proton translocation, involved in the formation of the N2 (4Fe-4S) iron-sulfur cluster, associate to Leigh syndrome
	GAMT	Guanidinoacetate N-methyltransferase	DNA damage repair, creatine biosynthesis, involved in p53-dependent apoptosis
19q13.33			
Region F	AP2A1	Adaptor-related protein complex 2, alpha 1 subunit	Involved in the formation of clathrin-coated vesicles, mediated endocytosis from the plasma membrane
	FUZ	Fuzzy homolog	Role in cilia formation, Hedgehog (Hh) signal transduction and embryonic development in mammals
	MED25	Mediator complex subunit 25	Regulates transcriptional activity retinoic acid receptor and role in xenobiotic metabolism and lipid homeostasis
	PTOV1	Prostate tumor overexpressed 1	Increased cancer proliferation in vivo and in vitro and associated to aggressive human carcinomas
	PNKP	Polynucleotide kinase 3'-phosphatase	Repair of DNA strand breaks

**Table 3: LOH in NB's cell lines CD133<sup>low</sup> population.**

Regions	Symbol	Gene name	Functions
<b>16q12.1</b>			
Region G	ABCC11	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 11	Role in drugs resistance and enhance cellular efflux of cyclic nucleotides
	ABCC12	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 12	Role in drugs resistance and probable transporter
	SHCBP1	Shc SH2-domain binding protein 1	Cell cycle progression
	VPS35	Vacuolar protein sorting 35 homolog	Implicated in the transport of sortilin from endosomes to the trans-Golgi network and mediates vesicle transport between the mitochondria and peroxisomes
	ORC6	Origin recognition complex, subunit 6	Involved in DNA replication, chromosome segregation and cytokinesis and involved in ribosome biogenesis
	MYLK3	Myosin light chain kinase 3	Role in sarcomere assembly via phosphorylation of myosin regulatory light chain 2V
	C16orf87	Chromosome 16 open reading frame 87	unknown
	GPT2	Glutamic pyruvate transaminase 2	Contributes to gluconeogenesis and amino acid metabolism
	DNAJA2	DnaJ homolog, subfamily A, member 2	Co-chaperone of Hsc70 and modulates G protein signaling
	NETO2	Neuropilin and tolloid-like 2	Involved in neural and vascular patterning
	ITFG1	Integrin alpha FG-GAP repeat containing 1	Role in cell-cell and cell extracellular matrix (EM) interactions
	PHKB	Phosphorylase kinase, beta	Involved in the regulation of glycogen breakdown
	LONP2	Ion peptidase 2, peroxisomal	Role in the quality control of proteins in cells
	SIAH1	Seven in absentia homolog 1	Role in cancer progression, DNA damage reponse and apoptosis
<b>21q21.3</b>			
Region H	USP16	Ubiquitin specific peptidase 16	Regulates gene expression in G1/S phase and facilitates cell cycle M-phase progression
	CCT8	Chaperonin containing T-complex polypeptide 1, subunit 8	Role in folding the cytoskeleton proteins actin and tubulin
	C21orf7	Chromosome 21 open reading frame 7	unknown

**Table 4:** Clinical features of the 36 NB cases studied with SNP analysis

<b>Characteristics of the cases</b>	<b>Number (%)</b>
Total number	36 (100)
Gender	
Male	20 (55.6)
Female	16 (44.4)
Age at diagnosis	
Median age in months	29
> 18 months	17 (47.2)
< 18 months	19 (52.8)
Clinical stage (INSS)	
1	5 (13.9)
2	7 (19.4)
3	5 (13.9)
4	16 (44.4)
4S	3 (8.3)
Survival in 2010	
Dead	12 (33.3)
Alive	24 (66.7)

### Figure legends

**Fig.1. Stem-like phenotype of CD133<sup>high</sup> NB cell.** CD133<sup>high</sup> and CD133<sup>low</sup> cells were isolated from NB-10, SK-N-SH, SK-N-DZ, SK-N-FI and IGR-N91. (A) Neurospheres assays were performed with  $2.5 \times 10^4$  selected NB cells. (B) Soft agar assays were realized using  $5 \times 10^3$  selected NB cells.

**Fig.2. Tumor-initiating potential of CD133<sup>high</sup> NB cells.** (A), Adrenal gland of an NSG mouse injected with 500 CD133<sup>low</sup> cells. (B), Adrenal gland tumor of an NSG mouse injected with 500 CD133<sup>high</sup> cells also invading the abdominal cavity. (C) Photomicrograph of a normal adrenal gland injected with 500 CD133<sup>low</sup> cells (medulla (M) and cortex (C)) (hematoxylin, Phloxine and saffron (HPS), X25), (D) High resolution of the adrenal gland tumor of the mouse injected with 500 CD133<sup>high</sup> cells. Mitoses (arrows) were frequent (HPS, X200). (E) Liver metastases were composed of isolated or small sheets of tumoral cells (arrows) frequently found in blood vessel (BV) (HPS, X400). (F) The same pathology is found in the lung, where we observe isolated tumoral cells in vessel (arrows) (HPS, X400). (G) By immunohistochemical staining of CD56, positive reaction was found only on the cell surface of metastatic tumoral cells (immunohistochemistry, CD56, X 400)

**Fig.3. Segmental chromosomal gains in CD133<sup>high</sup> NB cells.** Black bars illustrate the gain region; the positions of the anomalies are indicated in base pairs. (A) Gains on chromosome 16p13.3. (B) Gains on chromosome 19p13.3.



**Fig.4. Segmental chromosomal LOH in CD133<sup>low</sup> NB cells.** Black bars illustrate the LOH region; the positions of the anomalies are indicated in base pairs. (A) LOH on chromosome 16q12.1. (B) LOH on chromosome 21q21.3.

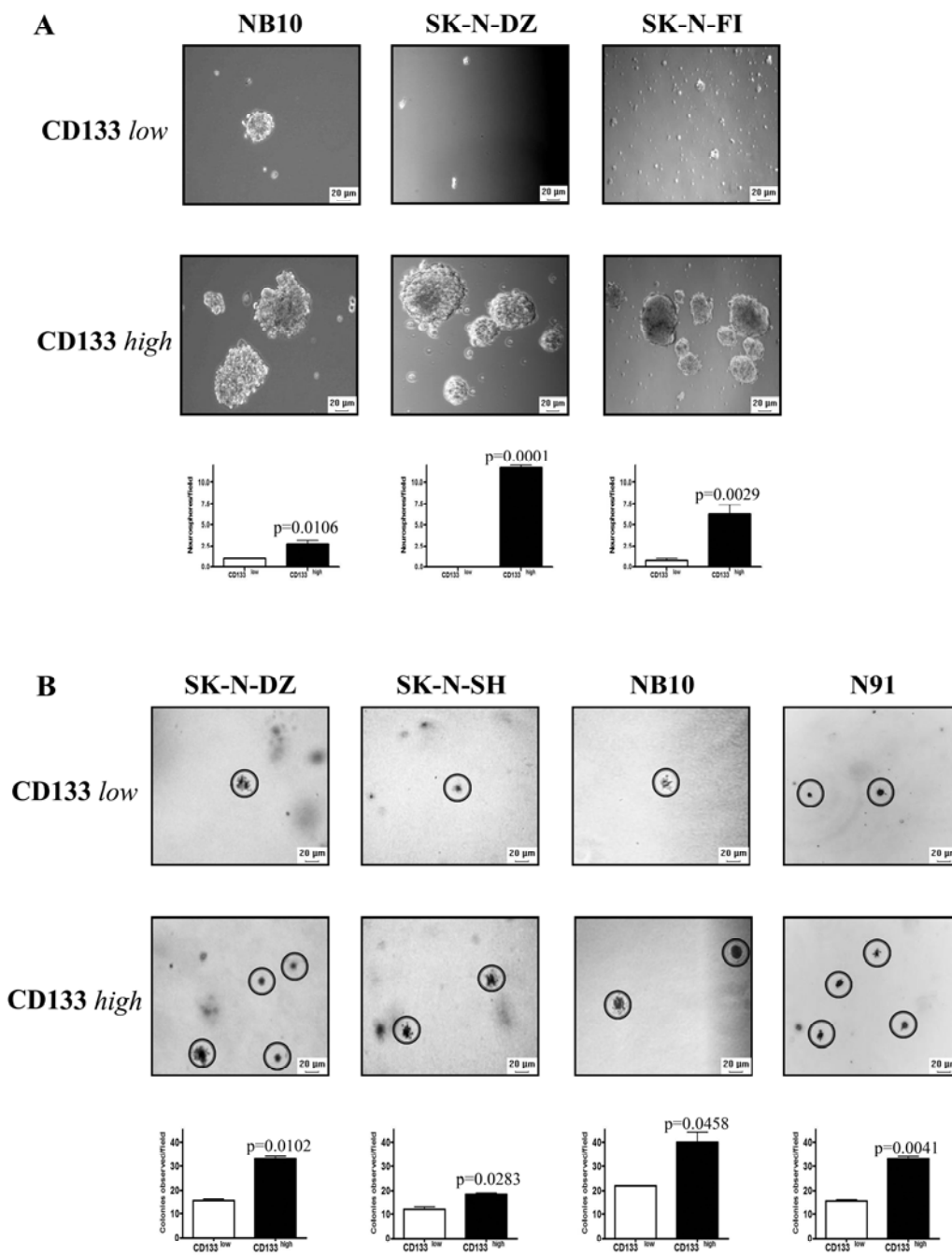
**Fig.5. Correlation between CD133 and EFNA2 expressions.**

CD133<sup>low</sup> and CD133<sup>high</sup> cells were sorted by FACS from SK-N-DZ and N91 cell lines. Western blotting demonstrated a correlation between the level of expression of CD133 and of EFNA2. ID: Identification.

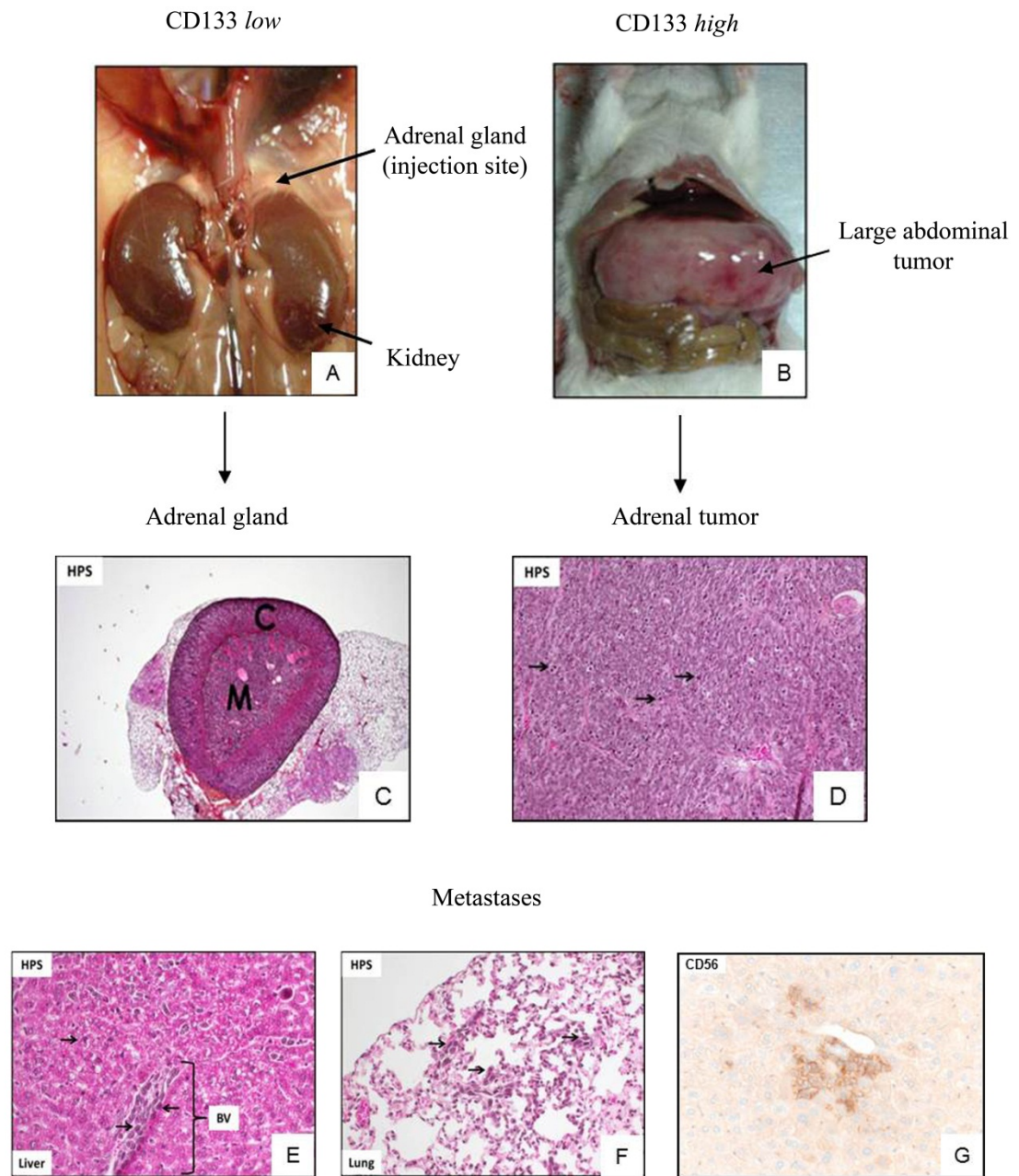
### Supplemental Data

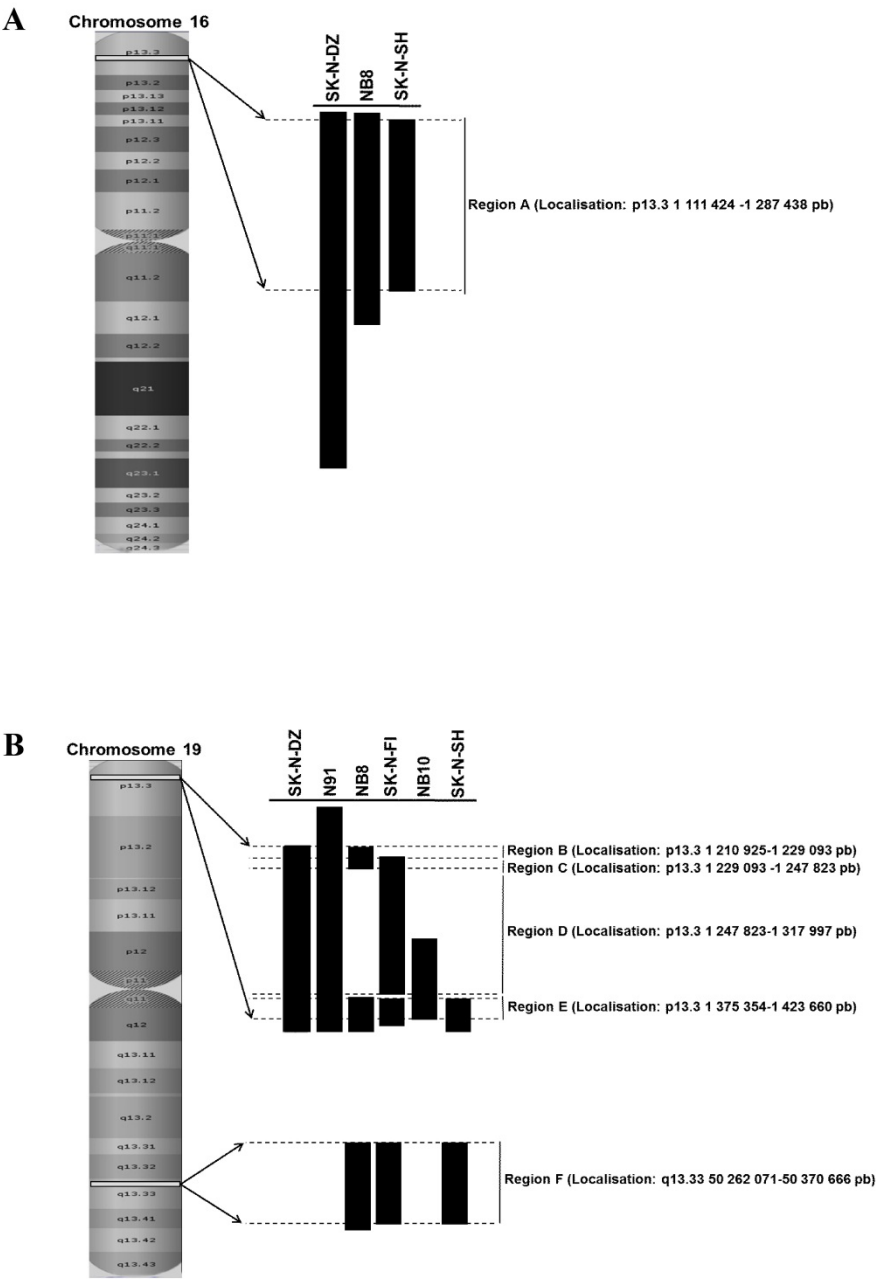
**Table 1:** Classical DNA abnormalities found in NB in our 6 cell lines determined by SNP genotyping.

	<b>1p36 LOH</b>	<b>11q23 LOH</b>	<b><i>MYCN</i> amplification</b>	<b>17q gain</b>
<b>SK-N-DZ</b>	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>SK-N-FI</b>	No	Yes	No	Yes
<b>SK-N-SH</b>	Yes	No	No	Yes
<b>NB10</b>	Yes	No	Yes	Yes
<b>N91</b>	Yes	No	Yes	No
<b>NB8</b>	Yes	No	Yes	No

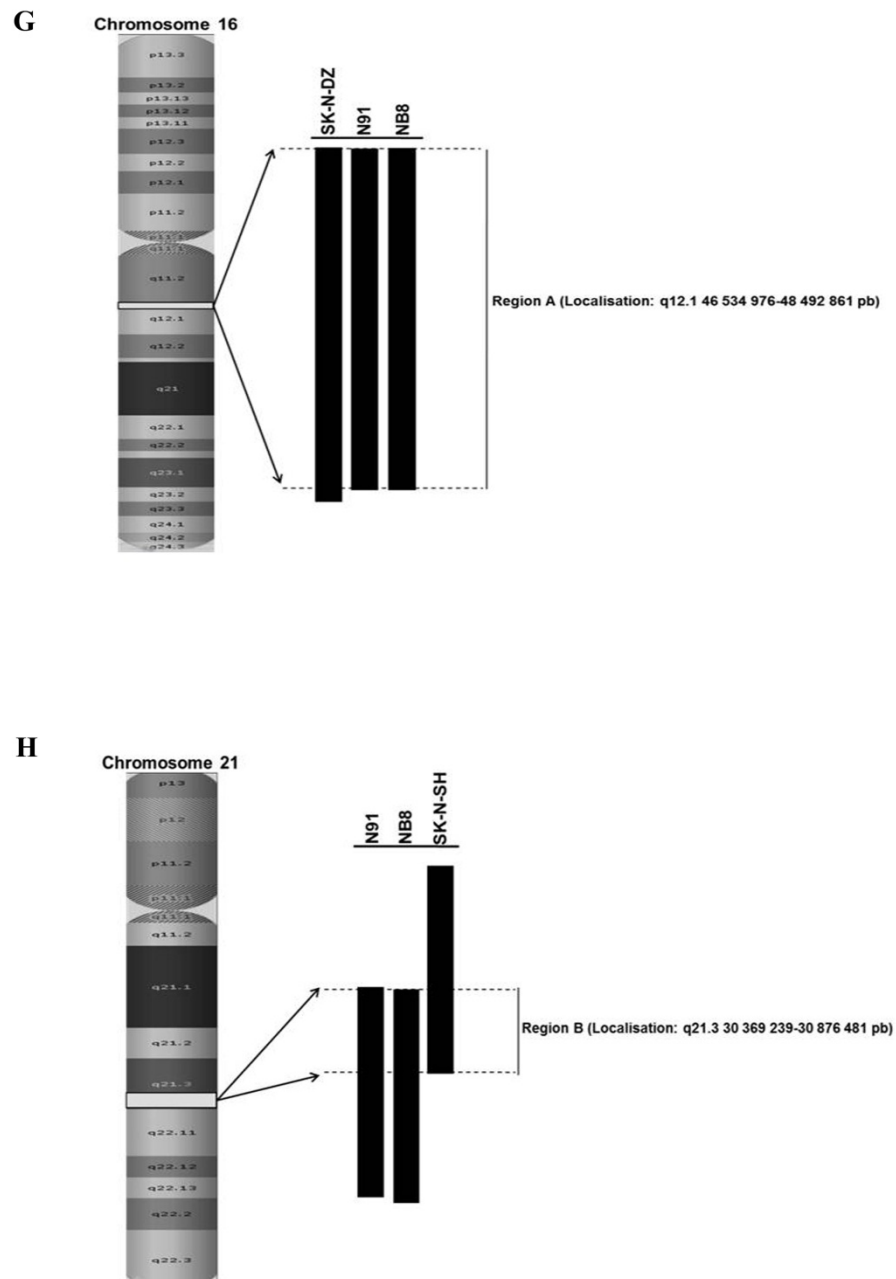


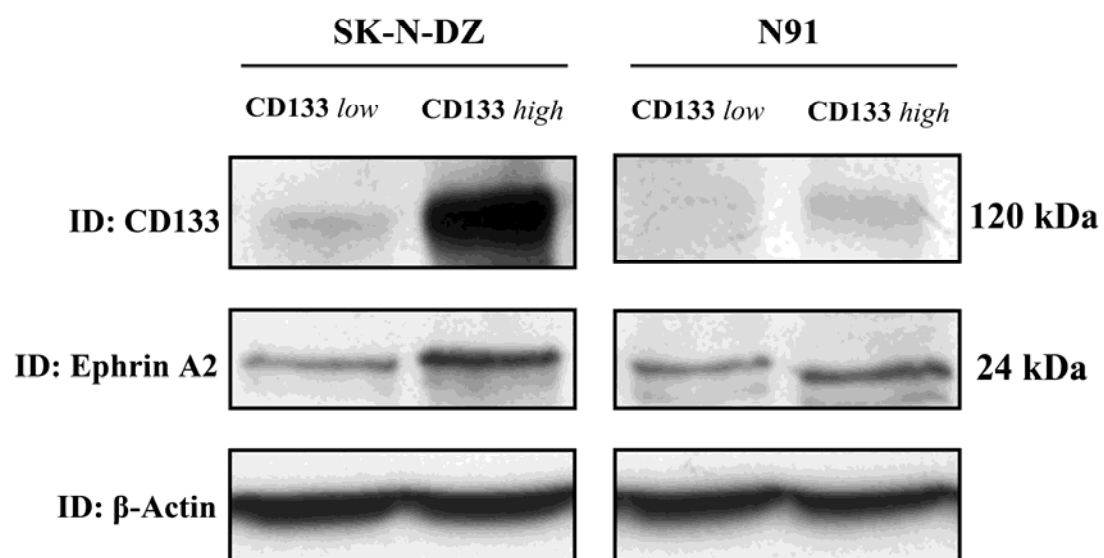
**Figure1** Cournoyer *et al.*

Figure 2 Cournoyer *et al*



**Figure 3** Cournoyer *et al.*





**Figure 5** Cournoyer *et al.*

# Résultats

## Chapitre 7

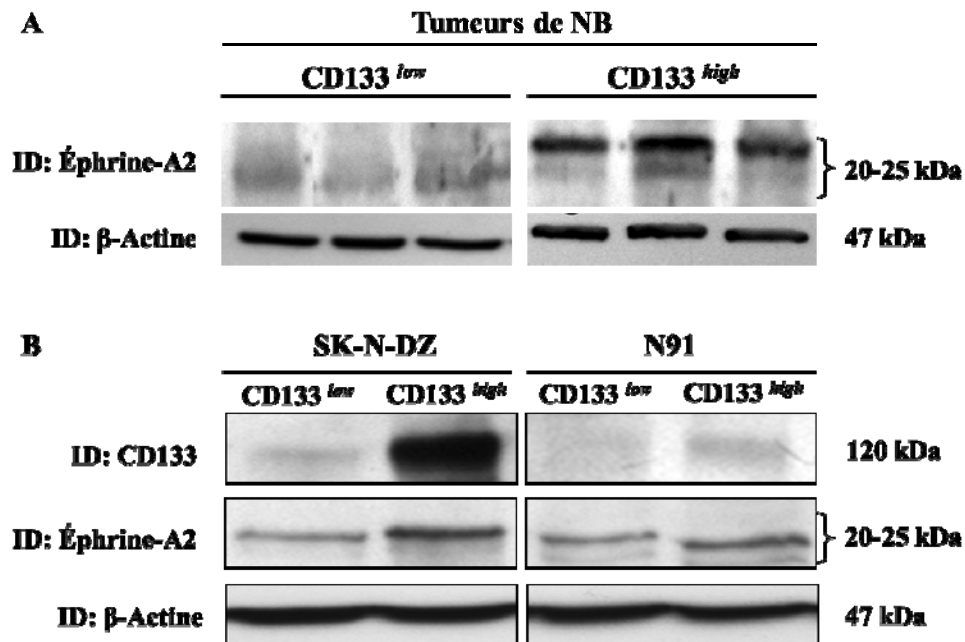
### 7.1 Résultats de l'article p. 41 à 80

### 7.2 Corrélation et implication d'éphrine-A2 dans le développement des TICs exprimant CD133

#### 7.2.1 *Expression différentielle d'éphrine-A2 dans les tumeurs de NB CD133<sup>high</sup>*

Puisque nous avons démontré dans l'article que les cellules enrichies en CD133 ont des vertus de TICs et que le gain génique d'*EFNA2* est retrouvé dans 50% des lignées cellulaires de NB suite à l'analyse du génome avec les SNPs, nous avons voulu vérifier l'expression protéique de ce gène d'intérêt. L'extraction protéique de 6 tumeurs de NB, qui ont été choisies en fonction de leur expression en CD133 (3 tumeurs CD133<sup>low</sup> et 3 tumeurs CD133<sup>high</sup>) et de deux lignées cellulaires préalablement triées avec l'anticorps CD133 par cytométrie de flux, a été effectuée afin de vérifier l'expression protéique d'éphrine-A2 dans chacun des échantillons. Selon la figure 8A, les résultats ont montré que les 3 tumeurs exprimant fortement CD133 (CD133<sup>high</sup>) ont une expression augmentée d'éphrine-A2 comparativement aux 3 autres qui expriment peu ou pas CD133 (CD133<sup>low</sup>). Le même résultat est obtenu à la figure 8B dans les lignées cellulaires SK-N-DZ et N91 (CD133<sup>low</sup> et CD133<sup>high</sup>). Donc, l'expression d'éphrine-A2 semble corrélée avec celle de CD133 dans les tumeurs et les lignées cellulaires de NB.



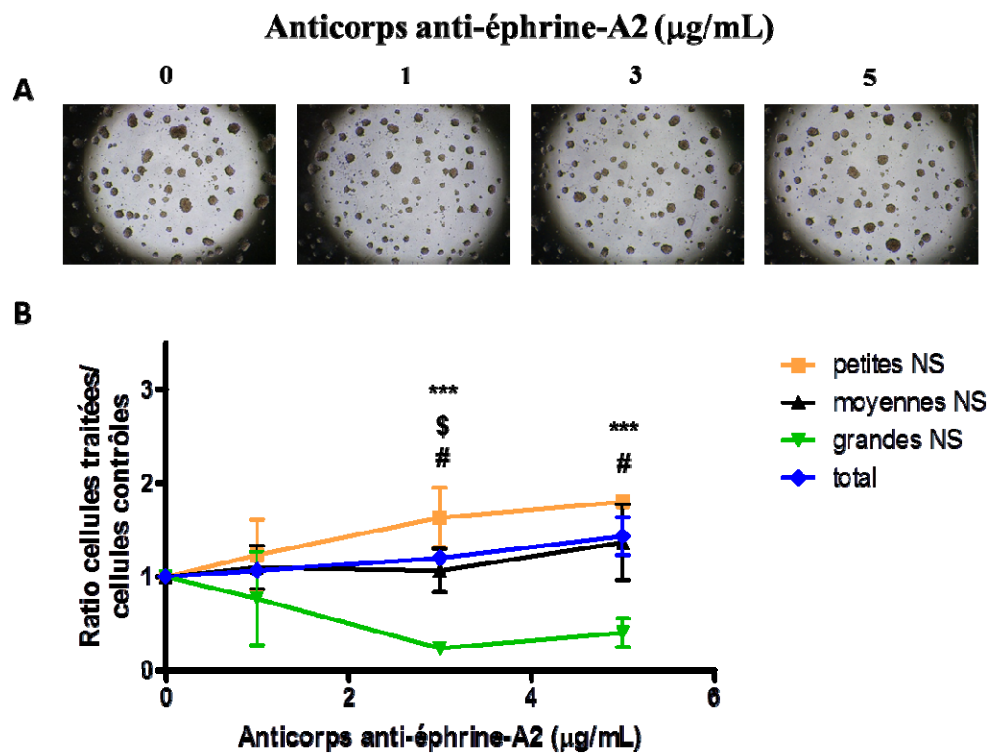


**Figure 8.** Expression d'éphrine-A2 augmentée dans les tumeurs et les lignées cellulaires de NB enrichies en CD133. (A) Six tumeurs de stades 3 et 4 (INSS) (1-3 tumeurs CD133<sup>low</sup> et 4-6 tumeurs CD133<sup>high</sup>) ont été choisies. (B) Les populations cellulaires CD133<sup>low</sup> et CD133<sup>high</sup> ont été sélectionnées de SK-N-DZ et N91. Les niveaux d'expression d'éphrine-A2 et de la CD133 ont été déterminés par Western Blot. ID : Immunodétection.

### 7.2.2 Influence de l'éphrine-A2 sur la taille des neurosphères des cellules de neuroblastome

Nous avons voulu vérifier l'impact de l'anticorps éphrine-A2 lorsque celui-ci est ajouté dans un milieu contenant des neurosphères (NS) formées à partir de lignées cellulaires de NB. Par conséquent, des concentrations croissantes d'anticorps éphrine-A2 ont été ajoutées au milieu contenant des NS et celles-ci ont été observées et photographiées après 7 jours. Les NS ont été également comptées, mesurées avec le logiciel Image-Pro Plus 7.0. Les résultats ont été analysés par le test statistique ANOVA-bidirectionnel. Selon la figure 9A, les données obtenues montrent que le nombre de grandes NS diminue avec

l'augmentation de la concentration d'anticorps bloquant anti-éphrine-A2, tandis que le nombre de NS de petites et de moyennes tailles se trouve augmenté. Selon le test statistique réalisé à la figure 9B, nous observons un effet significatif dans la comparaison de la taille de NS lors de l'ajout des concentrations 3 et 5  $\mu\text{g/mL}$  d'anti-éphrine-A2 au milieu. À une concentration de 1  $\mu\text{g/mL}$  d'anti-éphrine-A2, ce n'est pas significatif. En ce qui concerne le nombre total de NS, il ne varie pas avec les concentrations croissantes d'anti-éphrine-A2.



**Figure 9 . Effet de l'anti-éphrine-A2 sur la taille des neurosphères.** (A) La formation des neurosphères a été analysée sur  $3 \times 10^3$  cellules/puits supplémentées avec des concentrations croissantes (1, 3 et 5  $\mu\text{g/mL}$ ) d'anticorps anti-éphrine-A2. Les neurosphères ont été photographiées avec une caméra Olympus Q Color 3. (B) La taille des neurosphères formées a été mesurée en pixels avec le logiciel Image-Pro Plus 7.0. Les analyses statistiques ont été faites avec le test ANOVA-bidirectionnel (logiciel Graphpad Prism). \*\*\* :  $p < 0.001$  petites NS vs grandes NS; \$ :  $p < 0.05$  moyennes NS vs grandes NS; # :  $p < 0.05$  grandes NS vs total; NS : neurosphères.

## Discussion

Le NB se caractérise par une grande hétérogénéité par son comportement clinique, allant d'une évolution défavorable de la tumeur malgré l'intensité thérapeutique à une guérison spontanée même si la tumeur s'accompagne d'une dissémination métastatique <sup>21, 105</sup>. La stratification selon le risque du NB d'après certains critères (INSS, âge du patient et facteurs histologiques et génétiques) a permis de mieux associer un traitement adéquat afin d'enrayer la tumeur, mais une grande proportion de NB, soit 40%, demeure encore résistante aux traitements et est potentiellement mortelle <sup>13</sup>. La découverte de facteurs pronostics génétiques, qui a permis une meilleure orientation dans le traitement du NB, fait maintenant partie des données essentielles lors du diagnostic de cette tumeur. De plus, la résistance du NB face aux diverses thérapeutiques et les marqueurs identifiés à la surface correspondant à une sous-population cellulaire laissent supposer que la théorie des TICs est applicable à la tumeur. L'analyse génotypique de cette sous-population à l'intérieur du NB permettant la découverte de nouvelles anomalies génétiques spécifiques qui représente des cibles potentielles dans le traitement de ce cancer <sup>3</sup>.

De nombreux progrès dans la compréhension de plusieurs fonctionnalités clés des TICs, tels que la notion de niche, l'identification de signaux régulant le phénomène d'adressage ou «homing» et la compréhension partielle des mécanismes contrôlant l'auto-renouvellement et la différenciation, ont été réalisés. Ces innovations ont produit des outils pour le développement de protocoles de thérapie cellulaire qui ont donné des résultats positifs dans les modèles précliniques <sup>107</sup>.

De nombreuses études ont mis en évidence la présence d'une petite population cellulaire à l'intérieur du NB qui possède des propriétés similaires à celles que possèdent les TICs <sup>82, 83, 108, 109</sup>. De plus, l'un des marqueurs utilisés afin d'isoler cette population cellulaire, la CD133, a été trouvé dans plusieurs tumeurs. En effet, il a été montré *in vivo* que la fraction cellulaire isolée exprimant la CD133 dans les tumeurs cérébrales a la propriété d'initier la formation de tumeurs dans le cerveau du modèle murin

immunodéficient (NOD/SCID : *non-obese diabetic, severe combined immunodeficient*). Ainsi, l'injection de seulement 100 cellules CD133<sup>high</sup> a permis le développement tumoral, alors que l'injection de 10<sup>5</sup> cellules CD133<sup>low</sup> n'engendre aucune tumeur <sup>110</sup>. Il en est de même pour le glioblastome où les cellules CD133 positives ont, elles aussi, des vertus de cellules souches <sup>111</sup>.

Dans notre étude, nous avons isolé les cellules qui exprimaient à leur surface cellulaire la protéine CD133 dans six lignées cellulaires (SK-N-DZ, SK-N-FI, SK-N-SH, NB10, NB8 et N91) de NB. Ensuite, nous avons observé une augmentation significative du nombre de neurosphères (NS) formées dans trois lignées cellulaires (NB10, SK-N-DZ et SK-N-FI) contenant la population CD133<sup>high</sup> comparativement à celle CD133<sup>low</sup>. Dans la littérature, la formation de NS a été largement utilisée pour identifier les cellules souches *in vitro*. La séparation des TICs dans le SNC a été réalisée avec des marqueurs antigéniques et en exploitant les conditions de culture *in vitro* développées pour les cellules souches neuronales normales <sup>111</sup>. En 1992, il a été démontré pour la première fois que les cellules du SNC qui prolifèrent sur des surfaces non adhérentes engendrent la formation des NS ressemblant à des agrégats sphériques cellulaires <sup>112, 113</sup>. Ces NS ont la capacité de générer les différents constituants cellulaires du cerveau comme les neurones, les astrocytes et les oligodendrocytes. En plus, elles peuvent à plusieurs reprises être séparées en cellules individuelles; une fraction de ces cellules pourra régénérer de nouvelles NS, ce qui leur confère une propriété d'auto-renouvellement <sup>114</sup>.

Une seconde observation concernant nos résultats obtenus par les NS est à noter : la taille. Parmi les trois lignées cellulaires qui ont formé des NS, seule NB10 a formé un nombre peu élevé de NS dans la population CD133<sup>low</sup> comparativement à sa population CD133<sup>high</sup>. On a observé une différence dans la taille des NS qui était plus grande dans la population CD133<sup>high</sup>. Selon la littérature, une hétérogénéité existe dans la taille des NS et il a été relaté que la taille indique la nature du clone fondateur, puisque chaque NS dérive

d'une cellule. Ce fait est confondu par des critères non uniformes concernant la quantification des NS à mesurer. La théorie concernant les NS suggère que les cellules souches engendrent des NS plus larges que celles provenant de cellules progénitrices. Il a également été rapporté que seules les NS larges peuvent subir des passages cellulaires contrairement à celles plus petites. Cependant une autre hypothèse suggère que les petites NS pourraient être le résultat d'une diminution de l'auto-renouvellement ou de la réponse altérée aux facteurs de croissance <sup>115</sup>. Donc, les paramètres controversés de la formation des NS ne permettent pas d'affirmer que cet essai tranche définitivement dans l'identification des TICs. Il doit être accompagné d'essais différents supplémentaires comme des essais sur la formation de colonies en agar mou (essais *in vitro*) et la formation de tumeurs et métastases dans un modèle murin (essais *in vivo*).

Le second résultat obtenu suite à l'isolement des cellules exprimant la protéine CD133 est celui concernant la formation de colonies indépendantes d'ancrage. Nos résultats indiquent une augmentation significative du nombre de colonies à l'intérieur de la population CD133<sup>high</sup> dans quatre lignées cellulaires (SK-N-DZ, SK-N-SH, NB10 et N91). Les colonies formées en agar mou démontrent que les cellules sont capables de proliférer indépendamment de l'ancrage. Développée en 1977, la méthode de l'agar mou a servi à démontrer la présence des TICs provenant des tumeurs humaines, puisque les TICs ont la propriété de croître sans ancrage. Les colonies formées provenant de TICs ont été observées dans différents types de cancer <sup>78</sup>. Il a été démontré que les colonies provenant de TICs ovariens et de myélomes formées en agar mou avaient une plus grande résistance aux médicaments anticancéreux <sup>116</sup>.

Aussi, la taille des colonies de la population CD133<sup>high</sup> que nous avons observées n'est pas aussi large que le montrent certaines études sur les TICs de diverses tumeurs dans l'agar mou. Il est à noter que les colonies n'ont pas les mêmes caractéristiques de croissance et de morphologie puisqu'elles diffèrent d'un type tumoral à l'autre <sup>78</sup>. Cependant, afin de

démontrer réellement que les cellules exprimant la CD133 possèdent des vertus de TICs, des essais *in vivo* doivent être effectués afin d'établir si les caractéristiques concordent toujours avec celles de la sous population observée dans le NB.

Dans notre recherche, le fait que ce ne sont pas toutes les lignées cellulaires qui ont formé des NS ou des colonies en agar mou est important d'être souligné. Nous pensons que suite à plusieurs passages effectués sur les lignées cellulaires, il y aurait une accumulation de mutations ainsi qu'une sélection clonale qui, progressivement, vont s'adapter à l'environnement des cellules qui est non physiologique<sup>117</sup>. Par conséquent, les TICs et leurs propriétés pourraient être perdues.

Les résultats que nous avons accumulés suite aux essais *in vivo* dans le modèle murin NOD/SCID- $\gamma$ c a permis d'observer la formation d'une tumeur lorsque 500 cellules SK-N-DZ de la population CD133<sup>high</sup> sont injectées orthotopiquement dans la médullosurrénale (principale localisation du NB) tandis que l'injection du même nombre de cellules provenant de la population CD133<sup>low</sup> n'induit pas de tumeur. Ces résultats concordent avec la théorie d'auto-renouvellement des TICs. Une de leurs capacités est d'initier des tumeurs *in vivo* en synthétisant toutes les populations tumorales différenciées correspondant à la tumeur primaire et peut être ensuite retransplantées sans perte du potentiel tumorigénique. Les TICs humaines peuvent donc initier des tumeurs chez les modèles animaux immunodéficients<sup>117</sup>. D'ailleurs, la première évidence des TICs dans les leucémies myéloïdes aigues a été montrée par des expériences de transplantation dans un modèle murin immunodéficient (SCID) en 1994. L'équipe a démontré que la leucémie est transférée à l'hôte par les cellules CD34<sup>+</sup> et non par celles CD34<sup>-</sup><sup>118</sup>. Cependant, les études sur les TICs dans les tumeurs solides ont été retardées à cause des difficultés techniques rencontrées, telles que la dissociation des tissus et la séparation des sous populations cellulaires dû à une mauvaise connaissance des marqueurs membranaires<sup>117</sup>.

En 2003, une équipe a montré que les TICs provenant du cancer du sein étaient capables d'induire des tumeurs *in vivo*. En effet, quelques 100 cellules transplantées ayant le phénotype CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> induisaient la formation de tumeurs dans un modèle murin alors que des dizaines de milliers de cellules avec un phénotype différent de celui mentionné n'ont pas réussi à former des tumeurs <sup>119</sup>. Maintenant, plusieurs études démontrant le comportement des TICs dans les xénogreffes ont été publiées dans plusieurs tumeurs solides humaines, comme celles de la prostate, du colon, du cerveau et cou, du pancréas, des poumons, des ovaires et de la vessie <sup>117</sup>.

Les études des TICs dans les xénogreffes utilisant le marqueur CD133 pour isoler la sous population ont déjà été effectuées dans certaines tumeurs solides. Mentionnée au début de la discussion, une étude a montré que les TICs provenant du glioblastome isolées par la glycoprotéine en question ont permis de développer un essai de xénogreffe. Seules les cellules CD133<sup>+</sup> pouvaient induire l'initiation de tumeurs dans le modèle murin NOD/SCID et pouvaient être retransplantées <sup>110</sup>. Outre cette étude, les TICs provenant du colon ayant été aussi isolées par le marqueur CD133 ont montré qu'elles peuvent se maintenir, et se différencier ainsi que rétablir l'hétérogénéité tumorale après une transplantation en série <sup>120</sup>. Cependant, de récents travaux ont émis un certain questionnement concernant l'utilisation de CD133 comme un marqueur des TICs. Une équipe a montré que les deux populations, soit CD133<sup>+</sup> et CD133<sup>-</sup>, montraient des métastases ayant une tumorigenèse à long terme dans les souris NOD/SCID. Pour le moment, il n'y a pas d'explications convaincantes à cette controverse <sup>121</sup>.

La modulation fonctionnelle des xénogreffes selon le site de greffe des TICs peut être attendue. Des études comparatives sur le développement des TICs entre les sites orthotopiques et ceux hétérotopiques sont disponibles sur quelques tumeurs seulement. Par exemple, les TICs ovariens de phénotype CD44<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup> (c-kit) greffées en sous-cutanée et par voie intrapéritonéale génèrent des tumeurs montrant aucune différence histologique importante <sup>122</sup>. Des greffes orthotopiques de TICs provenant du colon ont également été

injectées. Suite aux analyses histologiques des tumeurs, elles ne présentaient pas de différence évidente dans l'organisation de la tumeur; mais les greffes du colon ont rapidement donné des métastases hépatiques, ce qui n'a jamais été observé dans les injections sous-cutanées <sup>117</sup>. Également, des métastases formées à la rate, aux poumons et au foie ont été observées dans les greffes orthotopiques de TICs prostatiques (CD44<sup>+</sup>) contrairement à celles hétérotopiques <sup>123</sup>. Donc, il existe une différence significative entre les greffes orthotopiques et celles hétérotopiques. La première est capable de récapituler l'ensemble de la cascade métastatique, ce qui s'applique aux TICs. Par contre, les gestes expérimentaux reliés à cette technique requièrent une très grande précision <sup>117</sup>.

Les modèles murins associés aux greffes orthotopiques reproduisent les caractéristiques moléculaires et histologiques les plus près de celles retrouvées dans la tumeur originale du patient. Par contre, il est important de comparer les résultats obtenus *in vivo* à ceux *in vitro*, puisque il faut conjuguer les avantages offerts par les lignées cellulaires avec ceux offerts provenant des cellules tumorales primaires. Ces deux techniques expérimentales vont permettre de se rapprocher le plus près possible des conditions à l'intérieur de laquelle se situe la tumeur.

Avec toutes les données que nous avons cumulées avec des essais *in vitro* et *in vivo*, nous avons démontré que les cellules exprimant la CD133 à leur surface cellulaire ont des propriétés de TICs. Ces observations concordent avec la littérature qui associe la CD133 au TICs du NB. Il avait été montré en 2008 que la protéine transmembranaire CD133 était présente dans une proportion de 46,9% des 32 NB de patients. Les taux d'expression des stades 1-2, 3-4 et 4S étaient de 30,7%, 57,9% et 37,5% respectivement. De plus, il avait été montré que le temps de survie des patients n'ayant pas d'expression de CD133 sur leur NB était significativement plus long que ceux qui avaient une expression positive de CD133



Une étude récente réalisée en 2010 a démontré que les cellules de NB qui expriment la CD133 offrent une plus grande résistance aux agents chimiothérapeutiques communs utilisés. L'étude consiste à faire des essais de cytotoxicité avec quatre médicaments couramment utilisés dans le cancer (cisplatine, ectoposide, doxorubicine et carboplatine) sur deux lignées cellulaires de NB. Les cellules isolées par des microbilles magnétiques (CD133<sup>+</sup>) se trouvent être plus résistantes que les autres cellules (CD133<sup>-</sup>) lors de la mise en contact avec les médicaments. Ces avancées ont permis à l'équipe d'affirmer que ces cellules pourraient être une stratégie d'approche dans le développement de traitements plus efficaces dans le NB <sup>125</sup>. Une autre étude a montré qu'après l'isolement des cellules de NB par la CD133, les cellules CD133<sup>+</sup> augmentent la formation de tumeurs ainsi que leur taille dans un modèle murin comparativement à celles CD133<sup>-</sup> <sup>126</sup>. Enfin, une autre étude faite en 2010 a pu montrer que les cellules CD133<sup>+</sup> répriment la différenciation cellulaire des NB, comme l'extension des neurites et l'expression de marqueurs de différenciation. L'équipe a montré que cette sous population accélère la prolifération cellulaire et engendre la formation de colonies indépendamment de l'ancrage. Elle a aussi montré que la CD133 favorise la survie cellulaire dans la formation de NS et qu'avec des expériences *in vivo*, le marqueur initie de nouvelles tumeurs dans les souris <sup>91</sup>. Donc, nos résultats convergent avec les expériences développées des dernières années et démontrent que la CD133 semble être un bon marqueur des TICs dans le NB.

Suite à la vérification des propriétés des TICs des cellules de NB exprimant la CD133, nous avons effectué une étude génotypique différentielle sur le génome entier afin d'étudier les altérations génétiques pouvant avoir lieu dans les cellules CD133<sup>high</sup> et dans celles CD133<sup>low</sup>.

Avant même la découverte des séquences du génome humain, il était évident que certains sites de variations génétiques pouvaient être utilisés comme marqueurs afin d'identifier des modèles de ségrégation des maladies. Cette approche a amené à l'identification d'un nombre de gènes impliqués dans de rares maladies monogéniques <sup>127</sup>.

Maintenant que les séquences du génome humain ont été identifiées, le défi actuel est d'identifier des gènes impliqués dans les maladies polygéniques <sup>128</sup>. Ainsi, les marqueurs de choix qui ont émergés des scans du génome entier et des études d'association sont les SNPs qui représentent le type le plus fréquent des variations dans le génome humain. Ils fournissent des outils puissants pour une variété d'études génétiques en raison de leur abondance et de leur stabilité <sup>129</sup>.

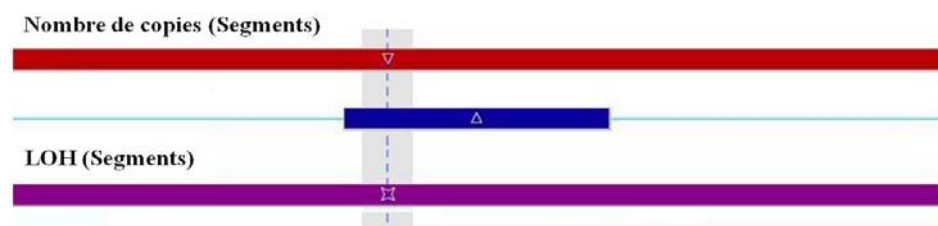
Au début, des études associées à des familles et aux couples de jumeaux ont fourni la preuve que certains cancers étaient probablement d'origine génétique <sup>130</sup>. L'analyse par les SNPs peut être alors utilisée comme outil de dépistage pour trouver ces nouvelles anomalies possiblement impliquées dans le diagnostic et/ou le pronostic ce, même si elles sont de petites tailles. Les études d'association au génome entier (GWAS : *Genome-Wide Association Study*) dans le cancer ont déjà identifié plus de 150 régions associées à une vingtaine de cancers spécifiques. Par exemple, pour ne nommer que cette étude-là, des analyses préliminaires réalisées en 2009 avec des SNPs dans le cancer du sein ont montré qu'un sous-ensemble de locus découverts peut être spécifique à la présence du récepteur à l'œstrogène alors que d'autres locus peuvent être corrélés à l'absence du récepteur à l'œstrogène. Cependant, de nouvelles études sont nécessaires afin d'inclure la nouvelle classification des cancers du sein basée sur les mirco-puces <sup>131</sup>. Le défi des études génomiques dans le cancer est que chacune des régions confère une petite contribution à augmenter le risque d'apparition du cancer. Puisque le cancer est associé à de multiples anomalies, il est donc difficile de considérer toutes les SNPs comme un test clinique. Alors, il faudrait des analyses génotypiques supplémentaires afin d'archiver la susceptibilité des allèles suivies par la compréhension des interactions entre les régions génétiques ainsi que le rôle de l'environnement. Même si les SNPs fournissent des données très précises, soit en donnant la longueur et la localisation exactes des anomalies, il serait important que de nouvelles études soient faites afin de valider l'utilité des variants génétiques connus dans l'évaluation du risque du cancer ainsi que les résultats qui s'y rattachent <sup>130</sup>.

Nous avons choisi de faire l'analyse génomique avec des SNPs, mais ce n'est pas la seule technique pouvant être utilisée lors de ce type d'analyse. En effet, déterminer les anomalies chromosomiques dans le NB est aussi important lorsqu'il est temps de mettre en évidence le pronostic de celui-ci. Actuellement, les techniques telles que l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH : *Fluorescent In Situ Hybridization*) et l'hybridation génomique comparative (CGH : *Comparative genomic hybridization* ) sont utilisées en clinique pour la détection des anomalies chromosomiques. D'ailleurs, ces techniques détectent des aberrations génétiques situées entre 1 et 20 Mb <sup>132</sup>. La limite principale associée à la FISH est qu'elle n'offre pas d'analyse globale du génome. On doit se fier uniquement aux régions chromosomiques ciblées <sup>133</sup>. La technique de la CGH quand à elle, ne peut reconnaître, par exemple, la perte d'un allèle suivie par une duplication d'un autre allèle tel que la disomie uniparentale acquise <sup>132</sup>. De plus, les réarrangements équilibrés tels que les translocations ou les inversions ne peuvent pas être détectés par cette méthode <sup>134</sup>. Donc, les SNPs sont sans aucun doute la technique la plus puissante afin d'observer toutes les aberrations possibles sur le génome entier tout en détectant les réarrangements chromosomiques.

Les GWAS associées au NB sont limitées, mais en 2007, une étude a été réalisée sur le NB avec des SNPs. En tenant compte que le NB est caractérisé par des altérations chromosomiques corrélées à des données biologiques et cliniques, l'intérêt de George *et al.* (2007) était d'analyser le nombre de copies des échantillons d'ADN de NB de haut risque avec des SNPs 10K d'Affymetrix. L'étude de l'équipe a démontré que les aberrations du nombre de copie de l'ADN représentent des prédicateurs importants, autant dans le phénotype de la tumeur que du comportement clinique du NB. Donc, l'évaluation des altérations de l'ADN par les SNPs pourrait fournir des signatures génomiques qui peuvent être utiles afin de prédire le pronostic du NB dans le futur <sup>135</sup>. Une seconde étude utilisant les SNPs 100K d'Affymetrix dans le NB a démontré une concordance moyenne de 96% entre la tumeur primitive et la lignée cellulaire ayant une LOH brute <sup>136</sup>.

Cependant, une étude génomique a été réalisée sur les TICs en utilisant le marqueur CD133 en 2011. Suite à l'obtention des populations CD133<sup>high</sup> et CD133<sup>low</sup> sur cinq lignées cellulaires de carcinomes colorectales et 12 tumeurs primaires colorectales, les profils génétiques respectifs de ces deux populations ont été étudiés par la technique de la CGH. L'étude a démontré qu'en effet, les cellules CD133 positives ont un profil génétique différent du reste des autres cellules <sup>137</sup>. Par exemple, le gène *CTNNB*, qui est impliqué dans la voie de signalisation cellulaire de Wnt, est fortement régulé dans ces cellules CD133 positives.

Lorsque les résultats des SNPs ont été complétés par Génome Québec, nous avons utilisé le logiciel ChAS (version CytoB-N1.1.0.638 (R3620)) afin de les interpréter. En plus de fournir une vue globale du génome entier, ce logiciel permet de sélectionner une ou plusieurs zones d'intérêts. Ces zones d'intérêts fournissent des renseignements sur les régions de gains, d'amplifications, de délétions et de LOH (figure 10), selon le seuil choisi, soit 50 kb. Ce logiciel permet également de vérifier la qualité de chacun des échantillons (deux populations sélectionnées dans chacune des six lignées cellulaires), d'obtenir des données numériques liées aux anomalies (par exemple la taille des anomalies) et d'identifier le ou les gènes et les variants se localisant dans la ou les régions où les anomalies se trouvent.



**Figure 10. Anomalies géniques pouvant se retrouver dans les six lignées cellulaires de NB.** Avec le logiciel ChAS, des anomalies de gènes peuvent être retrouvées sur tous les chromosomes. Une délétion (en rouge), un gain (en bleu) et une LOH (en mauve) peuvent recouvrir partiellement ou complètement le chromosome. Illustration adaptée du logiciel ChAS.

Enfin, nous avons réalisé l'analyse des SNPs sur les lignées cellulaires de NB et non sur les tumeurs de patients. Il existe en effet une contamination par les éléments du stroma qui peut survenir lors des analyses sur des tumeurs. Cette contamination peut masquer la détection d'anormalités clonales dans les échantillons tumorales. D'ailleurs, une étude a démontré qu'une contamination par les éléments normaux du stroma peut masquer les LOH et la détermination du nombre de copie <sup>136</sup>.

Dans une étude précédente, réalisée dans le laboratoire sur 36 neuroblastomes et en cours de publication, nous avons pu démontrer une bonne corrélation entre les variants du nombre de copies (CNV : *Copy number variant*) détectés par les SNPs et les résultats obtenus en FISH.

Suite à l'analyse des SNPs sur les six lignées cellulaires de NB, nous avons retenu un gène, soit *EFNA2* (ou nommé *éphrine-A2*) qui, selon la littérature, est intéressant pour la suite de nos objectifs de travail. En général, la classe A de récepteur à l'éphrine (EphA1 à EphA10) se lie aux éphrines de la sous-classe A (éphrine-A1 à éphrine-A5) qui sont ancrés à la membrane cellulaire par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI). La classe B de récepteurs (EphB1 à EphB6) se lie à la sous-classe B d'éphrines (éphrine-B1 à éphrine-B3) qui possède un domaine transmembranaire suivi par une courte région cytoplasmique <sup>138</sup>. D'un point de vue général, l'éphrine-A2 est un ligand fortement exprimé lors de l'embryogenèse et régule certains processus développementaux, comme le guidage axonale et l'angiogenèse. Récemment, des études ont révélé une implication de ce ligand dans la régulation des fonctions des cellules souches adultes ainsi que dans la tumorigenèse <sup>139</sup>.

Il existe très peu d'études sur la relation entre *EFNA2* et les cellules souches. En 2005, une étude a révélé qu'*EFNA2* régule négativement la prolifération des cellules progénitrices tumorales lorsqu'elle est induite. En effet, les cellules à l'intérieur de la niche des cellules souches neuronales du cerveau adulte prolifèrent plus et ont un cycle cellulaire plus court que les cellules manquant *EFNA2* <sup>140</sup>. Cependant, le rôle des éphrines dans la

régulation du renouvellement des cellules souches et progénitrices reste à mieux définir et va susciter plusieurs études d'intérêts dans un avenir rapproché.

L'expression des éphrines est fréquemment altérée dans les tumeurs lorsque celles-ci sont comparées au tissu d'origine. Les éphrines utilisent les voies de signalisation MAPK/ERK en employant plusieurs adaptateurs protéiques, ce qui engendre une réorganisation du cytosquelette avec des implications pour les phénotypes tumoraux. La signification biologique des éphrines est liée au développement et à la différenciation tumorale, à l'angiogenèse et à la tumorigenèse. Il y a plusieurs évidences qui montrent l'implication des éphrines et de leurs récepteurs dans ces concepts. Par exemple, une étude a montré qu'une surexpression de l'ARNm EphA2, A7, A10 et des éphrines-A2 et B3 est impliquée dans la tumorigenèse et/ou dans l'invasion tumorale dans les lignées cellulaires de carcinomes mammaires <sup>141</sup>. Par ailleurs, une autre étude a démontré que l'ARNm d'EFNA2 était significativement surexprimé dans les lignées cellulaires ainsi que dans les tumeurs de carcinomes hépatocellulaires. De plus, l'équipe a établi que l'expression d'EFNA2 régule positivement la croissance tumorale *in vivo* tandis que le «knockdown» de ce gène inhibe les effets oncogéniques. Ces résultats suggèrent ainsi que l'*EFNA2* pourrait être impliqué dans l'initiation et la progression tumorales des carcinomes hépatocellulaires <sup>142</sup>. Bref, une meilleure connaissance des voies de signalisation qu'empruntent les éphrines et leurs récepteurs afin d'influencer la tumorigenèse pourrait contribuer au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cancer <sup>138</sup>.

Nous avons pris en considération deux autres gènes dans l'analyse génotypique : *STK11* qui était surexprimée dans la population CD133<sup>high</sup> et *ORC6* qui avait une LOH dans la population CD133<sup>low</sup>. Présent sur le chromosome 19p13.3, *STK11* est présent dans la voie de signalisation kinase phosphoinositide-3 (PI3K)-AKT qui est importante dans le NB, car elle est présente et activée *in vitro* dans le NB <sup>143, 144</sup>. *STK11* a aussi un rôle antiapoptotique dans les cellules tumorales qui ont la voie AKT active, ce qui suggère que ce gène peut être potentiellement oncogène <sup>145-147</sup>. Situé sur le chromosome 16q12.1, *ORC6*

est impliqué dans le cycle de division cellulaire et peut entraîner une ségrégation chromosomique et ainsi, contribuer à l'aneuploïdie observée dans les tumeurs <sup>148</sup>. Il a été montré que la dérégulation d'*ORC6* sensibilise les cellules cancéreuses du colon aux traitements avec la cisplatine et la 5-Fluorouracile <sup>149</sup>. Donc, cette LOH observée dans la population CD133<sup>low</sup> peut expliquer la chimiosensibilité de l'ensemble des cellules tumorales comparativement aux cellules des TICs. Cependant, les données préliminaires obtenues avec l'expression protéique de ces deux molécules n'ont pas été concluantes.

Pour toutes les raisons énumérées ci-haut, nous avons évalué, dans un premier temps, l'expression protéique d'éphrine-A2, qui avait un gain de 14 kpb dans les cellules SK-N-DZ, N91 et SK-N-FI lors de l'analyse génotypique, dans 6 tumeurs ainsi que dans 2 lignées cellulaires sélectionnées (CD133<sup>low</sup> et CD133<sup>high</sup>) de NB. Il s'est avéré que les tumeurs et les lignées cellulaires qui expriment fortement la CD133 montraient une corrélation avec une augmentation de l'expression d'éphrine-A2 et que celles qui exprimaient que faiblement la CD133 ont une expression faible de cette protéine d'intérêt. Comme il a été démontré que les cellules exprimant la CD133 ont des propriétés de TICs, il est intéressant de faire une corrélation entre ces données observées dans les tumeurs ainsi que l'étude démontrant la présence d'éphrine dans les cellules souches. Comme précédemment mentionné, une étude a établi une influence des éphrines ainsi que de leurs récepteurs sur les cellules souches neurales et leurs progénitrices pendant le développement ainsi qu'à l'âge adulte. Il a été démontré qu'une perte génétique d'éphrine-B1 dans les cellules progénitrices neuroépithéliales engendrait une perte de cellules progénitrices pendant la neurogenèse corticale <sup>139</sup>. Donc, les TICs exprimant la CD133 aurait un gain d'éphrine-A2, ce qui aurait un impact sur le développement des TICs.

Dans un second temps, lors d'essais sur la formation de NS avec des concentrations croissantes d'anticorps bloquant anti-éphrine-A2 sur une lignée cellulaire de NB (SK-N-DZ), les résultats montrent qu'il y a une augmentation de petites NS ainsi qu'une diminution de grandes NS lorsqu'on augmente la concentration de l'anticorps bloquant

l'éphrine-A2. Cependant, le nombre de NS ne varie pas. L'effet de l'augmentation de la concentration d'anti-éphrine-A2 n'est pas statistiquement significatif, mais il semble y avoir une tendance. Puisque ces résultats représentent  $n=1$ , il serait important de refaire cette expérience. Il a déjà été démontré que les NS de petites tailles ne sont pas constituées de cellules souches neurales, mais plutôt de cellules neurales progénitrices, puisqu'elles sont reconnues pour avoir un potentiel prolifératif limité. Une étude préalable avait montré que les NS ayant une taille inférieure à 2 mm génèrent seulement des NS ayant une taille inférieure à 1 mm ou bien, elles ne forment aucune NS, indiquant ainsi une lacune dans le processus d'auto-renouvellement <sup>150</sup>. Donc, à la lumière de ces données, il semble que l'éphrine-A2 interviendrait dans le développement des NS en plus d'influencer les cellules souches neurales et progénitrices tel que mentionné plus haut.

Malgré le fait que leur surexpression et leur rôle potentiel dans la cancérologie a été démontré dans certaines tumeurs, les éphrines et leurs récepteurs ne constituent pas une preuve définitive, car plusieurs gènes sont dérégulés dans la cascade d'événements conduisant à la formation tumorale. Donc, il serait important d'établir si la dérégulation d'*EFNA2* est nécessaire dans les TICs lors du développement de la cancérogenèse ou s'il s'agit que de la conséquence d'un tel processus. L'ensemble de ces travaux pourraient identifier de nouvelles cibles géniques pour le développement des médicaments contrant le NB.



## Conclusion

Les caractéristiques particulières présentées dans le NB représentent un véritable défi dans le traitement thérapeutique de ce dernier afin de diminuer son incidence. La théorie des TICs dans le NB est déjà établie en bonne partie, mais des études subséquentes sont de toutes évidences importantes afin de mieux comprendre la mécanistique de cette population cellulaire.

Suite à l'établissement de nos hypothèses et objectifs de travail, les résultats présentés dans ce mémoire font la démonstration que la population enrichie en CD133 dans les lignées cellulaires de NB présente des caractéristiques associées aux TICs. La formation augmentée de NS et de colonies dans l'agar mou et celle de tumeurs et de métastases dans le modèle murin NOD/SCID- $\gamma$ c ont permis de suggérer que cette population cellulaire exprimant le CD133 concorde avec la propriété des TICs établies dans la littérature. L'analyse génotypique différentielle a permis d'observer qu'il y avait un bagage génétique associé aux cellules enrichies en CD133 qui diffère des autres cellules tumorales. Certains résultats préliminaires réalisés avec l'anticorps d'éphrine-A2 ont permis de justifier sa présence et son impact dans les TICs du NB à cause de son expression augmentée dans les tumeurs CD133<sup>high</sup> ainsi que dans le développement des NS.

Il serait important de confirmer les résultats de l'analyse génotypique différentielle obtenus par la méthode FISH. De plus, il serait intéressant d'aller vérifier l'impact de l'*EFNA2* dans le modèle murin, avoir un plus grand échantillonnage de tumeurs exprimant la CD133 et d'observer son expression dans les lignées cellulaires utilisées lors de cette étude afin de confirmer nos données préliminaires.

## Bibliographie

1. A. B. Rothenberg, W. E. Berdon, G. J. D'Angio, D. J. Yamashiro and R. A. Cowles, *Pediatr Radiol*, 2009, **39**, 155-160.
2. J. M. Maris, M. D. Hogarty, R. Bagatell and S. L. Cohn, *Lancet*, 2007, **369**, 2106-2120.
3. J. M. Maris, *N Engl J Med*, 2010, **362**, 2202-2211.
4. M. Minoux and F. M. Rijli, *Development*, 2010, **137**, 2605-2621.
5. A. V. Morales, J. A. Barbas and M. A. Nieto, *Semin Cell Dev Biol*, 2005, **16**, 655-662.
6. L. S. Gammill and M. Bronner-Fraser, *Nat Rev Neurosci*, 2003, **4**, 795-805.
7. N. M. Joseph, Y. S. Mukoyama, J. T. Mosher, M. Jaegle, S. A. Crone, E. L. Dormand, K. F. Lee, D. Meijer, D. J. Anderson and S. J. Morrison, *Development*, 2004, **131**, 5599-5612.
8. T. Motohashi, K. Yamanaka, K. Chiba, K. Miyajima, H. Aoki, T. Hirobe and T. Kunisada, *Dev Dyn*, 2011.
9. L. F. Ellison, P. De, L. S. Mery, P. E. Grundy and C. C. S. s. S. C. f. C. C. Statistics, *CMAJ*, 2009, **180**, 422-424.
10. M. A. Smith, N. L. Seibel, S. F. Altekruse, L. A. Ries, D. L. Melbert, M. O'Leary, F. O. Smith and G. H. Reaman, *J Clin Oncol*, 2010, **28**, 2625-2634.
11. R. J. Deyell and E. F. Attiyeh, *Cancer Genet*, 2011, **204**, 113-121.
12. J. E. Heck, B. Ritz, R. J. Hung, M. Hashibe and P. Boffetta, *Paediatr Perinat Epidemiol*, 2009, **23**, 125-143.
13. G. M. Brodeur, *Nat Rev Cancer*, 2003, **3**, 203-216.
14. E. Hiyama, T. Iehara, T. Sugimoto, M. Fukuzawa, Y. Hayashi, F. Sasaki, M. Sugiyama, S. Kondo, A. Yoneda, H. Yamaoka, T. Tajiri, K. Akazawa and M. Ohtaki, *Lancet*, 2008, **371**, 1173-1180.
15. H. J. Brisse, M. B. McCarville, C. Granata, K. B. Krug, S. L. Wootton-Gorges, K. Kanegawa, F. Giammarile, M. Schmidt, B. L. Shulkin, K. K. Matthay, V. J. Lewington, S. Sarnacki, B. Hero, M. Kaneko, W. B. London, A. D. Pearson, S. L. Cohn and T. Monclair, *Radiology*, 2011.
16. T. Martinsson, R. M. Sjöberg, F. Hedborg and P. Kogner, *Cancer Genet Cytogenet*, 1997, **95**, 183-189.
17. R. W. Miller and J. H. Rubinstein, *Am J Med Genet*, 1995, **56**, 112-115.
18. S. W. Moore, *Pediatr Surg Int*, 2006, **22**, 305-315.

19. G. Yoon, G. Graham, R. Weksberg, H. P. Gaul, M. R. DeBaun and M. J. Coppes, *Med Pediatr Oncol*, 2002, **38**, 193-199.
20. R. E. George, S. E. Lipshultz, S. R. Lipsitz, S. D. Colan and L. Diller, *J Pediatr*, 2004, **144**, 444-448.
21. Y. Pérel, D. Valteau-Couanet, J. Michon, F. Lavrand, C. Coze, C. Bergeron, A. Notz, D. Plantaz, P. Chastagner, F. Bernard, C. Thomas and H. Rubie, *Arch Pediatr*, 2004, **11**, 834-842.
22. G. J. Lonergan, C. M. Schwab, E. S. Suarez and C. L. Carlson, *Radiographics*, 2002, **22**, 911-934.
23. K. Lakhoo and H. Sowerbutts, *Pediatr Surg Int*, 2010, **26**, 1159-1168.
24. S. J. Smith, N. N. Diehl, B. D. Smith and B. G. Mohny, *Eye (Lond)*, 2010, **24**, 1792-1796.
25. J. A. Ross and S. M. Davies, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 1999, **8**, 189-194.
26. I. Janoueix-Lerosey, G. Schleiermacher and O. Delattre, *Oncogene*, 2010, **29**, 1566-1579.
27. F. H. Schilling, C. Spix, F. Berthold, R. Erttmann, N. Fehse, B. Hero, G. Klein, J. Sander, K. Schwarz, J. Treuner, U. Zorn and J. Michaelis, *The New England journal of medicine*, 2002, **346**, 1047-1053.
28. S. Barrette, M. L. Bernstein, J. M. Leclerc, M. A. Champagne, Y. Samson, J. Brossard and W. G. Woods, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2006, **24**, 1542-1545.
29. K. Yamamoto, S. Ohta, E. Ito, Y. Hayashi, T. Asami, O. Mabuchi, M. Higashigawa and M. Tanimura, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 2002, **20**, 1209-1214.
30. J. Vermeulen, K. De Preter, P. Mestdagh, G. Laureys, F. Speleman and J. Vandesompele, *Discov Med*, 2010, **10**, 29-36.
31. G. M. Brodeur, J. Pritchard, F. Berthold, N. L. Carlsen, V. Castel, R. P. Castelberry, B. De Bernardi, A. E. Evans, M. Favrot and F. Hedborg, *J Clin Oncol*, 1993, **11**, 1466-1477.
32. T. Monclair, G. M. Brodeur, P. F. Ambros, H. J. Brisse, G. Cecchetto, K. Holmes, M. Kaneko, W. B. London, K. K. Matthay, J. G. Nuchtern, D. von Schweinitz, T. Simon, S. L. Cohn, A. D. Pearson and I. T. Force, *J Clin Oncol*, 2009, **27**, 298-303.
33. M. Peuchmaur, E. S. d'Amore, V. V. Joshi, J. Hata, B. Roald, L. P. Dehner, R. B. Gerbing, D. O. Stram, J. N. Lukens, K. K. Matthay and H. Shimada, *Cancer*, 2003, **98**, 2274-2281.
34. T. R. Gershon, A. Shirazi, L. X. Qin, W. L. Gerald, A. M. Kenney and N. K. Cheung, *PLoS One*, 2009, **4**, e7491.

35. A. Nakagawara, M. Arima, C. G. Azar, N. J. Scavarda and G. M. Brodeur, *Cancer Res*, 1992, **52**, 1364-1368.
36. T. A. Ishola and D. H. Chung, *Surg Oncol*, 2007, **16**, 149-156.
37. B. H. Kushner, S. D. Yeh, K. Kramer, S. M. Larson and N. K. Cheung, *J Clin Oncol*, 2003, **21**, 1082-1086.
38. C. A. Perez, K. K. Matthay, J. B. Atkinson, R. C. Seeger, H. Shimada, G. M. Haase, D. O. Stram, R. B. Gerbing and J. N. Lukens, *J Clin Oncol*, 2000, **18**, 18-26.
39. D. L. Baker, M. L. Schmidt, S. L. Cohn, J. M. Maris, W. B. London, A. Buxton, D. Stram, R. P. Castleberry, H. Shimada, A. Sandler, R. C. Shamberger, A. T. Look, C. P. Reynolds, R. C. Seeger, K. K. Matthay and C. s. O. Group, *N Engl J Med*, 2010, **363**, 1313-1323.
40. A. L. Yu, A. L. Gilman, M. F. Ozkaynak, W. B. London, S. G. Kreissman, H. X. Chen, M. Smith, B. Anderson, J. G. Villablanca, K. K. Matthay, H. Shimada, S. A. Grupp, R. Seeger, C. P. Reynolds, A. Buxton, R. A. Reisfeld, S. D. Gillies, S. L. Cohn, J. M. Maris, P. M. Sondel and C. s. O. Group, *N Engl J Med*, 2010, **363**, 1324-1334.
41. N. Bown, *J Clin Pathol*, 2001, **54**, 897-910.
42. Y. P. Mossé, M. Laudenslager, L. Longo, K. A. Cole, A. Wood, E. F. Attiyeh, M. J. Laquaglia, R. Sennett, J. E. Lynch, P. Perri, G. Laureys, F. Speleman, C. Kim, C. Hou, H. Hakonarson, A. Torkamani, N. J. Schork, G. M. Brodeur, G. P. Tonini, E. Rappaport, M. Devoto and J. M. Maris, *Nature*, 2008, **455**, 930-935.
43. T. Iwahara, J. Fujimoto, D. Wen, R. Cupples, N. Bucay, T. Arakawa, S. Mori, B. Ratzkin and T. Yamamoto, *Oncogene*, 1997, **14**, 439-449.
44. I. Janoueix-Lerosey, D. Lequin, L. Brugières, A. Ribeiro, L. de Pontual, V. Combaret, V. Raynal, A. Puisieux, G. Schleiermacher, G. Pierron, D. Valteau-Couanet, T. Frebourg, J. Michon, S. Lyonnet, J. Amiel and O. Delattre, *Nature*, 2008, **455**, 967-970.
45. M. Schwab, K. Alitalo, K. H. Klempnauer, H. E. Varmus, J. M. Bishop, F. Gilbert, G. Brodeur, M. Goldstein and J. Trent, *Nature*, 1983, **305**, 245-248.
46. G. M. Brodeur, R. C. Seeger, M. Schwab, H. E. Varmus and J. M. Bishop, *Science*, 1984, **224**, 1121-1124.
47. R. C. Seeger, G. M. Brodeur, H. Sather, A. Dalton, S. E. Siegel, K. Y. Wong and D. Hammond, *N Engl J Med*, 1985, **313**, 1111-1116.
48. S. O'Neill, L. Ekstrom, M. Lastowska, P. Roberts, G. M. Brodeur, U. R. Kees, M. Schwab and N. Bown, *Genes Chromosomes Cancer*, 2001, **30**, 87-90.
49. F. Gilbert, M. Feder, G. Balaban, D. Brangman, D. K. Lurie, R. Podolsky, V. Rinaldt, N. Vinikoor and J. Weisband, *Cancer Res*, 1984, **44**, 5444-5449.

50. V. Combaret, S. Bréjon, I. Iacono, G. Schleiermacher, G. Pierron, A. Ribeiro, C. Bergeron, A. Marabelle and A. Puisieux, *Pediatr Blood Cancer*, 2011, **56**, 757-761.
51. M. H. Yong, W. S. Hwang, L. A. Knight, W. Fung, M. Y. Chan, W. T. Seow and C. H. Chui, *Singapore Med J*, 2009, **50**, 1090-1094.
52. N. Bown, S. Cotterill, M. Lastowska, S. O'Neill, A. D. Pearson, D. Plantaz, M. Meddeb, G. Danglot, C. Brinkschmidt, H. Christiansen, G. Laureys, F. Speleman, J. Nicholson, A. Bernheim, D. R. Betts, J. Vandesompele and N. Van Roy, *N Engl J Med*, 1999, **340**, 1954-1961.
53. A. Islam, H. Kageyama, N. Takada, T. Kawamoto, H. Takayasu, E. Isogai, M. Ohira, K. Hashizume, H. Kobayashi, Y. Kaneko and A. Nakagawara, *Oncogene*, 2000, **19**, 617-623.
54. J. Vandesompele, E. Michels, K. De Preter, B. Menten, A. Schramm, A. Eggert, P. F. Ambros, V. Combaret, N. Francotte, F. Antonacci, A. De Paepe, G. Laureys, F. Speleman and N. Van Roy, *Int J Cancer*, 2008, **122**, 1177-1182.
55. F. Saito-Ohara, I. Imoto, J. Inoue, H. Hosoi, A. Nakagawara, T. Sugimoto and J. Inazawa, *Cancer Res*, 2003, **63**, 1876-1883.
56. G. M. Brodeur, G. Sekhon and M. N. Goldstein, *Cancer*, 1977, **40**, 2256-2263.
57. C. T. Fong, N. C. Dracopoli, P. S. White, P. T. Merrill, R. C. Griffith, D. E. Housman and G. M. Brodeur, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, **86**, 3753-3757.
58. F. Franke, B. Rudolph, H. Christiansen, J. Harbott and F. Lampert, *J Cancer Res Clin Oncol*, 1986, **111**, 266-272.
59. M. Gehring, F. Berthold, L. Edler, M. Schwab and L. C. Amler, *Cancer Res*, 1995, **55**, 5366-5369.
60. E. R. Okawa, T. Gotoh, J. Manne, J. Igarashi, T. Fujita, K. A. Silverman, H. Xhao, Y. P. Mosse, P. S. White and G. M. Brodeur, *Oncogene*, 2008, **27**, 803-810.
61. J. M. Maris, M. J. Weiss, C. Guo, R. B. Gerbing, D. O. Stram, P. S. White, M. D. Hogarty, E. P. Sulman, P. M. Thompson, J. N. Lukens, K. K. Matthay, R. C. Seeger and G. M. Brodeur, *J Clin Oncol*, 2000, **18**, 1888-1899.
62. E. S. Srivatsan, K. L. Ying and R. C. Seeger, *Genes Chromosomes Cancer*, 1993, **7**, 32-37.
63. C. Guo, P. S. White, M. J. Weiss, M. D. Hogarty, P. M. Thompson, D. O. Stram, R. Gerbing, K. K. Matthay, R. C. Seeger, G. M. Brodeur and J. M. Maris, *Oncogene*, 1999, **18**, 4948-4957.
64. J. M. Maris and K. K. Matthay, *J Clin Oncol*, 1999, **17**, 2264-2279.
65. M. Fischer, T. Bauer, A. Oberthür, B. Hero, J. Theissen, M. Ehrich, R. Spitz, R. Eils, F. Westermann, B. Brors, R. König and F. Berthold, *Oncogene*, 2010, **29**, 865-875.

66. T. Suzuki, J. Yokota, H. Mugishima, I. Okabe, M. Ookuni, T. Sugimura and M. Terada, *Cancer Res*, 1989, **49**, 1095-1098.
67. M. Theobald, H. Christiansen, A. Schmidt, B. Melekian, N. Wolkewitz, N. M. Christiansen, C. Brinkschmidt, F. Berthold and F. Lampert, *Genes Chromosomes Cancer*, 1999, **26**, 40-46.
68. C. T. Fong, P. S. White, K. Peterson, C. Sapienza, W. K. Cavenee, S. E. Kern, B. Vogelstein, A. B. Cantor, A. T. Look and G. M. Brodeur, *Cancer Res*, 1992, **52**, 1780-1785.
69. J. Vandesompele, N. Van Roy, M. Van Gele, G. Laureys, P. Ambros, P. Heimann, C. Devalck, E. Schuuring, P. Brock, J. Otten, J. Gyselinck, A. De Paepe and F. Speleman, *Genes Chromosomes Cancer*, 1998, **23**, 141-152.
70. C. J. Breen, A. O'Meara, M. McDermott, M. Mullarkey and R. L. Stallings, *Cancer Genet Cytogenet*, 2000, **120**, 44-49.
71. D. R. Betts, N. Cohen, K. E. Leibundgut, T. Kühne, U. Caflisch, J. Greiner, L. Traktenbrot and F. K. Niggli, *Pediatr Blood Cancer*, 2005, **44**, 147-157.
72. J. Takita, Y. Hayashi and J. Yokota, *Eur J Cancer*, 1997, **33**, 1971-1973.
73. Y. Kaneko, N. Kanda, N. Maseki, M. Sakurai, Y. Tsuchida, T. Takeda and I. Okabe, *Cancer Res*, 1987, **47**, 311-318.
74. T. Schatton, N. Y. Frank and M. H. Frank, *Bioessays*, 2009, **31**, 1038-1049.
75. H. Clevers, *Nat Med*, 2011, **17**, 313-319.
76. G. H. Heppner, *Cancer Res*, 1984, **44**, 2259-2265.
77. P. C. Nowell, *Cancer Res*, 1986, **46**, 2203-2207.
78. A. W. Hamburger and S. E. Salmon, *Science*, 1977, **197**, 461-463.
79. M. Al-Hajj and M. F. Clarke, *Oncogene*, 2004, **23**, 7274-7282.
80. D. Subramaniam, S. Ramalingam, C. W. Houchen and S. Anant, *Mini Rev Med Chem*, 2010, **10**, 359-371.
81. B. M. Boman and M. S. Wicha, *J Clin Oncol*, 2008, **26**, 2795-2799.
82. R. A. Ross and B. A. Spengler, *Semin Cancer Biol*, 2007, **17**, 241-247.
83. S. Qi, J. Zheng, H. Zhu, L. Yang and X. Xiao, *J Pediatr Surg*, 2010, **45**, 2305-2311.
84. U. Günthert, M. Hofmann, W. Rudy, S. Reber, M. Zöller, I. Haussmann, S. Matzku, A. Wenzel, H. Ponta and P. Herrlich, *Cell*, 1991, **65**, 13-24.
85. N. Reguart, B. He, M. Taron, L. You, D. M. Jablons and R. Rosell, *Future Oncol*, 2005, **1**, 787-797.

86. C. Sheridan, H. Kishimoto, R. K. Fuchs, S. Mehrotra, P. Bhat-Nakshatri, C. H. Turner, R. Goulet, S. Badve and H. Nakshatri, *Breast Cancer Res*, 2006, **8**, R59.
87. S. Ricardo, A. F. Vieira, R. Gerhard, D. Leitão, R. Pinto, J. F. Cameselle-Teijeiro, F. Milanezi, F. Schmitt and J. Paredes, *J Clin Pathol*, 2011.
88. E. K. Siapati, E. Rouka, D. Kyriakou and G. Vassilopoulos, *Cell Oncol (Dordr)*, 2011.
89. J. E. Visvader and G. J. Lindeman, *Nat Rev Cancer*, 2008, **8**, 755-768.
90. A. H. Yin, S. Miraglia, E. D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. G. Leary, J. Olweus, J. Kearney and D. W. Buck, *Blood*, 1997, **90**, 5002-5012.
91. H. Takenobu, O. Shimozato, T. Nakamura, H. Ochiai, Y. Yamaguchi, M. Ohira, A. Nakagawara and T. Kamijo, *Oncogene*, 2011, **30**, 97-105.
92. P. Schiapparelli, M. Enguita-Germán, J. Balbuena, J. A. Rey, P. Lázcoz and J. S. Castresana, *Oncol Rep*, 2010, **24**, 1355-1362.
93. J. H. Park, S. J. Park, M. K. Chung, K. H. Jung, M. R. Choi, Y. Kim, Y. G. Chai, S. J. Kim and K. S. Park, *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, **396**, 637-642.
94. C. N. Landen, B. Goodman, A. A. Katre, A. D. Steg, A. M. Nick, R. L. Stone, L. D. Miller, P. V. Mejia, N. B. Jennings, D. M. Gershenson, R. C. Bast, R. L. Coleman, G. Lopez-Berestein and A. K. Sood, *Mol Cancer Ther*, 2010, **9**, 3186-3199.
95. N. Oishi and X. W. Wang, *Int J Biol Sci*, 2011, **7**, 517-535.
96. D. N. Odashiro, A. N. Odashiro, P. R. Pereira, K. Godeiro, E. Antecka, S. Di Cesare and M. N. Burnier, *Cancer Cell Int*, 2006, **6**, 26.
97. M. M. Gottesman, *Annu Rev Med*, 2002, **53**, 615-627.
98. V. N. Ivanov, M. A. Partridge, G. E. Johnson, S. X. Huang, H. Zhou and T. K. Hei, *Exp Cell Res*, 2008, **314**, 1163-1176.
99. G. I. Keshet, I. Goldstein, O. Itzhaki, K. Cesarkas, L. Shenhav, A. Yakirevitch, A. J. Treves, J. Schachter, N. Amariglio and G. Rechavi, *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **368**, 930-936.
100. L. M. Hansford, A. E. McKee, L. Zhang, R. E. George, J. T. Gerstle, P. S. Thorner, K. M. Smith, A. T. Look, H. Yeger, F. D. Miller, M. S. Irwin, C. J. Thiele and D. R. Kaplan, *Cancer Res*, 2007, **67**, 11234-11243.
101. J. Ridge, D. A. Terle, E. Dragunsky and I. Levenbook, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1996, **32**, 238-248.
102. O. Krupkova, T. Loja, M. Redova, J. Neradil, K. Zitterbart, J. Sterba and R. Veselska, *Tumour Biol*, 2011.
103. A. Yasuda, H. Sawai, H. Takahashi, N. Ochi, Y. Matsuo, H. Funahashi, M. Sato, Y. Okada, H. Takeyama and T. Manabe, *Mol Cancer*, 2006, **5**, 46.

104. O. Morozova, M. Vojvodic, N. Grinshtein, L. M. Hansford, K. M. Blakely, A. Maslova, M. Hirst, T. Cezard, R. D. Morin, R. Moore, K. M. Smith, F. Miller, P. Taylor, N. Thiessen, R. Varhol, Y. Zhao, S. Jones, J. Moffat, T. Kislinger, M. F. Moran, D. R. Kaplan and M. A. Marra, *Clin Cancer Res*, 2010, **16**, 4572-4582.
105. G. A. Adams, S. J. Shochat, E. I. Smith, J. J. Shuster, V. V. Joshi, G. Altshuler, F. A. Hayes, R. Nitschke, N. McWilliams and R. P. Castleberry, *Journal of pediatric surgery*, 1993, **28**, 372-377; discussion 377-378.
106. G. M. Brodeur, R. C. Seeger, A. Barrett, F. Berthold, R. P. Castleberry, G. D'Angio, B. De Bernardi, A. E. Evans, M. Favrot and A. I. Freeman, *J Clin Oncol*, 1988, **6**, 1874-1881.
107. M. Meregalli, A. Farini, M. Belicchi and Y. Torrente, *Expert Opin Biol Ther*, 2010, **10**, 1521-1528.
108. C. Rouleau, R. Smale, J. Sancho, Y. S. Fu, L. Kurtzberg, W. Weber, A. Kruger, C. Jones, S. Roth, C. Bormann, S. Dunham, R. Krumbholz, M. Curiel, G. Wallar, J. Mascarello, J. Campos-Rivera, B. Horten, S. Schmid, G. Miller and B. A. Teicher, *Int J Oncol*, 2011.
109. P. Castelo-Branco, C. Zhang, T. Lipman, M. Fujitani, L. Hansford, I. Clarke, C. B. Harley, R. Tressler, D. Malkin, E. Walker, D. R. Kaplan, P. Dirks and U. Tabori, *Clin Cancer Res*, 2011, **17**, 111-121.
110. S. K. Singh, C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano and P. B. Dirks, *Nature*, 2004, **432**, 396-401.
111. C. T. Jordan, M. L. Guzman and M. Noble, *N Engl J Med*, 2006, **355**, 1253-1261.
112. B. A. Reynolds, W. Tetzlaff and S. Weiss, *J Neurosci*, 1992, **12**, 4565-4574.
113. B. A. Reynolds and S. Weiss, *Science*, 1992, **255**, 1707-1710.
114. R. M. Seaberg and D. van der Kooy, *Trends Neurosci*, 2003, **26**, 125-131.
115. E. Pastrana, V. Silva-Vargas and F. Doetsch, *Cell Stem Cell*, 2011, **8**, 486-498.
116. S. E. Salmon, A. W. Hamburger, B. Soehnlen, B. G. Durie, D. S. Alberts and T. E. Moon, *N Engl J Med*, 1978, **298**, 1321-1327.
117. M. Baiocchi, M. Biffoni, L. Ricci-Vitiani, E. Piloizzi and R. De Maria, *Curr Opin Pharmacol*, 2010, **10**, 380-384.
118. T. Lapidot, C. Sirard, J. Vormoor, B. Murdoch, T. Hoang, J. Caceres-Cortes, M. Minden, B. Paterson, M. A. Caligiuri and J. E. Dick, *Nature*, 1994, **367**, 645-648.
119. M. Al-Hajj, M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison and M. F. Clarke, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, **100**, 3983-3988.
120. C. A. O'Brien, A. Pollett, S. Gallinger and J. E. Dick, *Nature*, 2007, **445**, 106-110.



121. S. V. Shmelkov, J. M. Butler, A. T. Hooper, A. Hormigo, J. Kushner, T. Milde, R. St Clair, M. Baljevic, I. White, D. K. Jin, A. Chadburn, A. J. Murphy, D. M. Valenzuela, N. W. Gale, G. Thurston, G. D. Yancopoulos, M. D'Angelica, N. Kemeny, D. Lyden and S. Rafii, *J Clin Invest*, 2008, **118**, 2111-2120.
122. S. Zhang, C. Balch, M. W. Chan, H. C. Lai, D. Matei, J. M. Schilder, P. S. Yan, T. H. Huang and K. P. Nephew, *Cancer Res*, 2008, **68**, 4311-4320.
123. L. Patrawala, T. Calhoun, R. Schneider-Broussard, H. Li, B. Bhatia, S. Tang, J. G. Reilly, D. Chandra, J. Zhou, K. Claypool, L. Coghlan and D. G. Tang, *Oncogene*, 2006, **25**, 1696-1708.
124. Q. S. Tong, L. D. Zheng, S. T. Tang, Q. L. Ruan, Y. Liu, S. W. Li, G. S. Jiang and J. B. Cai, *World J Pediatr*, 2008, **4**, 58-62.
125. S. D. Vangipuram, Z. J. Wang and W. D. Lyman, *Pediatr Blood Cancer*, 2010, **54**, 361-368.
126. Y. Y. Mahller, J. P. Williams, W. H. Baird, B. Mitton, J. Grossheim, Y. Saeki, J. A. Cancelas, N. Ratner and T. P. Cripe, *PLoS One*, 2009, **4**, e4235.
127. D. Botstein, R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis, *Am J Hum Genet*, 1980, **32**, 314-331.
128. D. Botstein and N. Risch, *Nat Genet*, 2003, **33 Suppl**, 228-237.
129. D. G. Wang, J. B. Fan, C. J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbell, E. Robinson, M. Mittmann, M. S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T. J. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee and E. S. Lander, *Science*, 1998, **280**, 1077-1082.
130. C. C. Chung and S. J. Chanock, *Hum Genet*, 2011, **130**, 59-78.
131. R. L. Milne, J. Benítez, H. Nevanlinna, T. Heikkinen, K. Aittomäki, C. Blomqvist, J. I. Arias, M. P. Zamora, B. Burwinkel, C. R. Bartram, A. Meindl, R. K. Schmutzler, A. Cox, I. Brock, G. Elliott, M. W. Reed, M. C. Southey, L. Smith, A. B. Spurdle, J. L. Hopper, F. J. Couch, J. E. Olson, X. Wang, Z. Fredericksen, P. Schürmann, M. Bremer, P. Hillemanns, T. Dörk, P. Devilee, C. J. van Asperen, R. A. Tollenaar, C. Seynaeve, P. Hall, K. Czene, J. Liu, Y. Li, S. Ahmed, A. M. Dunning, M. Maranian, P. D. Pharoah, G. Chenevix-Trench, J. Beesley, N. V. Bogdanova, N. N. Antonenkova, I. V. Zalutsky, H. Anton-Culver, A. Ziogas, H. Brauch, C. Justenhoven, Y. D. Ko, S. Haas, P. A. Fasching, R. Strick, A. B. Ekici, M. W. Beckmann, G. G. Giles, G. Severi, L. Baglietto, D. R. English, O. Fletcher, N. Johnson, I. dos Santos Silva, J. Peto, C. Turnbull, S. Hines, A. Renwick, N. Rahman, B. G. Nordestgaard, S. E. Bojesen, H. Flyger, D. Kang, K. Y. Yoo, D. Y. Noh, A. Mannermaa, V. Kataja, V. M. Kosma, M. García-Closas, S. Chanock, J. Lissowska, L. A. Brinton, J. Chang-Claude, S. Wang-Gohrke, C. Y. Shen, H. C. Wang, J. C. Yu, S. T. Chen, M. Bermisheva, T. Nikolaeva, E. Khusnutdinova, M.

- K. Humphreys, J. Morrison, R. Platte, D. F. Easton, k. Investigators, A. Group and B. C. A. Consortium, *J Natl Cancer Inst*, 2009, **101**, 1012-1018.
132. J. Carr, N. P. Bown, M. C. Case, A. G. Hall, J. Lunec and D. A. Tweddle, *Cancer Genet Cytogenet*, 2007, **172**, 127-138.
  133. M. Lastowska, E. Nacheva, A. McGuckin, A. Curtis, C. Grace, A. Pearson and N. Bown, *Genes Chromosomes Cancer*, 1997, **18**, 162-169.
  134. B. S. Emanuel and S. C. Saitta, *Nat Rev Genet*, 2007, **8**, 869-883.
  135. R. E. George, E. F. Attiyeh, S. Li, L. A. Moreau, D. Neuberg, C. Li, E. A. Fox, M. Meyerson, L. Diller, P. Fortina, A. T. Look and J. M. Maris, *PLoS One*, 2007, **2**, e255.
  136. S. L. Volchenboun, C. Li, S. Li, E. F. Attiyeh, C. P. Reynolds, J. M. Maris, A. T. Look and R. E. George, *Cancer Res*, 2009, **69**, 4143-4149.
  137. T. Gaiser, J. Camps, S. Meinhardt, D. Wangsa, Q. T. Nguyen, S. Varma, C. Dittfeld, L. A. Kunz-Schughart, R. Kemmerling, M. R. Becker, K. Heselmeyer-Haddad and T. Ried, *Am J Pathol*, 2011, **178**, 1478-1488.
  138. K. Kullander and R. Klein, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, **3**, 475-486.
  139. M. Genander and J. Frisén, *Curr Opin Cell Biol*, 2010, **22**, 611-616.
  140. J. Holmberg, A. Armulik, K. A. Senti, K. Edoff, K. Spalding, S. Momma, R. Cassidy, J. G. Flanagan and J. Frisén, *Genes Dev*, 2005, **19**, 462-471.
  141. B. P. Fox and R. P. Kandpal, *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **318**, 882-892.
  142. Y. X. Feng, J. S. Zhao, J. J. Li, T. Wang, S. Q. Cheng, Y. Yuan, F. Wang, X. F. Wang and D. Xie, *Hepatology*, 2010, **51**, 535-544.
  143. J. Fang, H. Tang, L. H. Xia, W. N. Wei, Y. Hu and S. J. Song, *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi*, 2007, **28**, 363-366.
  144. C. Wei, C. I. Amos, L. C. Stephens, I. Campos, J. M. Deng, R. R. Behringer, A. Rashid and M. L. Frazier, *Cancer research*, 2005, **65**, 11297-11303.
  145. D. Zhong, X. Liu, F. R. Khuri, S. Y. Sun, P. M. Vertino and W. Zhou, *Cancer research*, 2008, **68**, 7270-7277.
  146. P. Y. Zeng and S. L. Berger, *Cancer research*, 2006, **66**, 10701-10708.
  147. N. Martinez-Lopez, M. Varela-Rey, D. Fernandez-Ramos, A. Woodhoo, M. Vazquez-Chantada, N. Embade, L. Espinosa-Hevia, F. J. Bustamante, L. A. Parada, M. S. Rodriguez, S. C. Lu, J. M. Mato and M. L. Martinez-Chantar, *Hepatology*, 2010, **52**, 1621-1631.
  148. S. G. Prasanth, K. V. Prasanth and B. Stillman, *Science*, 2002, **297**, 1026-1031.
  149. E. J. Gavin, B. Song, Y. Wang, Y. Xi and J. Ju, *PLoS One*, 2008, **3**, e4054.

150. S. A. Louis, R. L. Rietze, L. Deleyrolle, R. E. Wagey, T. E. Thomas, A. C. Eaves and B. A. Reynolds, *Stem Cells*, 2008, **26**, 988-996.

